

Photophysikalische Grundlagen zur Fluoreszenzdiagnostik von Tumoren der Haut



Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

der Naturwissenschaftlichen Fakultät III –
Biologie und Vorklinische Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Günther Ackermann
aus Schergendorf

Februar 2001

Die vorliegende Arbeit wurde angeleitet von Prof. Dr. Elmar Lang.

Das Promotionsgesuch wurde eingereicht am 2. Februar 2001.

Im Prüfungsausschuss befanden sich:

Vorsitzender	Prof. Dr. Günter Hauska
Erstgutachter	Prof. Dr. Elmar Lang
Zweitgutachter	Prof. Dr. Michael Landthaler
3. Prüfer	Prof. Dr. Peter Hegemann

Inhaltsverzeichnis

Einleitung	1
1 Optik der Haut	3
1.1 Aufbau der Haut	3
1.2 Wechselwirkungen zwischen Licht und Haut	6
1.2.1 Reflexion	8
1.2.2 Brechung	11
1.2.3 Remission	13
1.2.4 Extinktion	15
1.2.5 Absorption	16
1.2.6 Streuung	19
1.3 Optische Eigenschaften der Haut	28
1.3.1 Mikroskopische Parameter	28
1.3.2 Makroskopische Messgrößen	30
1.3.3 Zusammenfassende Bemerkungen	43
1.4 Auswirkungen auf die Fluoreszenzdiagnostik	44
1.4.1 Eindringen von Licht in die Haut	44
1.4.2 Emission von Fluoreszenzlicht aus der Haut	45

2	Endogene und exogene Farbstoffe	53
2.1	Endogene Farbstoffe	54
2.1.1	Chromophore	54
2.1.2	Optisches Fenster	60
2.1.3	Autofluoreszenz	60
2.2	Exogene Farbstoffe	62
2.2.1	Eigenschaften von Photosensibilisatoren	64
2.2.2	Geschichtliche Entwicklung	65
2.2.3	Wirkungsmechanismen	66
2.2.4	Photodynamische Therapie	70
2.3	Messung von spektralen Eigenschaften	71
2.3.1	Absorption	71
2.3.2	Fluoreszenz	71
2.4	Indocyaningrün	73
2.4.1	Pharmakokinetik	74
2.4.2	Stabilität	74
2.4.3	Spektrale Eigenschaften	74
2.5	Protoporphyrin IX	95
2.5.1	Porphyrine	95
2.5.2	Löslichkeit	95
2.5.3	Spektrale Eigenschaften	97
3	Fluoreszenzdiagnostik <i>in vivo</i>	107
3.1	Methoden zur Quantifizierung	108
3.1.1	Fluoreszenzspektroskopie	108
3.1.2	Zeitaufgelöste Fluoreszenzmessung	109
3.1.3	Integrative Fluoreszenzmessung	110

3.2	Fluoreszenzbeeinflussende Faktoren	111
3.2.1	Ausbleichen von Farbstoffen	111
3.2.2	Fluoreszenzlöschung	112
3.2.3	Reabsorption und Reemission	117
3.3	Fluoreszenzmessungen am Tiermodell mit ICG	119
3.3.1	Tumormodell	119
3.3.2	Intravitale Fluoreszenzmikroskopie	120
3.3.3	Probleme bei der Visualisierung von ICG	122
3.3.4	Abklingverhalten von ICG <i>in vivo</i>	123
3.4	5-ALA-induzierte Fluoreszenz in Tumoren der Haut	133
3.4.1	Hämbiosynthese	133
3.4.2	Anhäufung von Porphyrinen nach exogener Gabe von 5-ALA . .	135
3.4.3	Selektivität von 5-ALA-induzierten Porphyrinen	135
3.4.4	Fluoreszenzmessplatz und Bildauswertung	136
3.4.5	Fluoreszenzintensitäten und -kinetiken von Läsionen der Haut .	142
3.4.6	Fluoreszenzgestützte Biopsie von Basalzellkarzinomen	150
Zusammenfassung		155
A Photobiologische Hauttypen des Menschen		159
B Korrekturen zur Messung der Transmission		161
C Berechnung der Fluoreszenzverteilung		163
Literaturverzeichnis		167
Danksagung		189

Einleitung

Die Fluoreszenzdiagnostik¹ (FD) ist ein neuartiges, nicht-invasives Verfahren zur Früherkennung und Abgrenzung von oberflächlichen Tumoren und dysplastischen² Geweben. Dazu wird, ähnlich wie in der Photodynamischen Therapie (PDT), ein Fluoreszenzfarbstoff appliziert, der sich anschließend möglichst selektiv nur in Tumorzellen anreichert und durch sein unter Anregung ausgesandtes Fluoreszenzlicht detektiert werden kann oder die Eigenfluoreszenz des Gewebes (*Autofluoreszenz*) analysiert.

Die fluoreszenzgestützte Detektion von Tumoren wurde zuerst in der Urologie entwickelt [KBH92, KBK94, KMA96]. Hier wird sie zum Nachweis von oberflächlichen Harnblasenkarzinomen mittlerweile in einer Phase-III-Studie auf ihre klinische Zulassung in Deutschland hin getestet [Kri98]. Es konnte gezeigt werden, dass mithilfe der FD eine höhere Sensitivität erreicht werden kann als mit konventioneller Weißlicht-Zytoskopie alleine [KBK96, JFM97]. Auch beim Nachweis von frühen Lungentumoren [LMH93], oberflächlichen Karzinomen im Mund- und Rachenraum [HLM95, LRS96] oder im Magen-Darm-Trakt [POS95, CSV96, SSB98] und der intraoperativen Abgrenzung von malignen Gliomen im Gehirn [SSW98] kann durch Verwendung der FD eine höhere Sensitivität als mit bisherigen Diagnostikverfahren erzielt werden.

In der Dermatologie kann die FD ein nützliches Instrument zur Hervorhebung und Abgrenzung von Tumoren bei chirurgischen Eingriffen sein [FBS96, FBM97]. Da auch die umliegende Haut, entzündetes Gewebe oder sonnengeschädigte Haut fluoreszieren kann [KPP90], werden zur Detektion der Fluoreszenz CCD-Kameras mit nachfolgender, digitaler Bildbearbeitung eingesetzt [EKS98, WGS99]. Zur Anregung der Fluoreszenz werden gefilterte, inkohärente Lichtquellen oder Laser verwendet.

¹In Anlehnung an die Photodynamische Therapie (PDT) wird die Fluoreszenzdiagnostik fälschlicherweise oft als *Photodynamische Diagnostik* (PDD) bezeichnet; jedoch ist gerade der photodynamische Effekt, nämlich der Übergang der Farbstoffmoleküle in das Triplet u. von hier ausgehend die Induktion von reaktiven Sauerstoffspezies, bei der Fluoreszenzdiagnostik unerwünscht.

²fehlgebildetes od. fehlentwickeltes Gewebe mit unzureichender Differenzierung; oftmals Vorstufe zum Tumor

Die bisher vielversprechendste Substanz bei der FD ist die 5-Aminolävulinsäure (ALA). ALA wird in der Hämbiosynthese zu Porphyrinen, insbesondere Protoporphyrin IX (PpIX), metabolisiert. Gibt man ALA exogen³ zu, kommt es in Tumorzellen zur Akkumulation von PpIX [KP92, PBM97]. PpIX kann nahe dem UV zur Fluoreszenz angeregt und damit lokalisiert werden. Durch die geringe Eindringtiefe von Licht im ultravioletten Spektralbereich werden jedoch nur oberflächliche Tumoren detektiert. Zudem führt die Abhängigkeit der Porphyrinproduktion von der Hämbiosyntheseaktivität zu großen interindividuellen Unterschieden in der Fluoreszenz. Ein Farbstoff, der diese Nachteile nicht hat, ist Indocyaningrün (ICG). ICG bindet nach intravenöser Gabe sehr schnell an Proteine im Blut. Da die Gefäße in Tumoren permeabler als im normalen Gewebe sind, kann der Farbstoff extravasieren und die Tumoren unter Fluoreszenzanregung markieren. Die maximale Absorption und Emission von ICG liegen im nahen IR.

Damit der im Gewebe angereicherte Farbstoff zur Fluoreszenz angeregt werden kann, muss das Anregungslicht genügend stark in die Haut eindringen. Hierbei sind die optischen Eigenschaften des Gewebes entscheidend. Ebenso kann das Fluoreszenzlicht auf seinem Weg aus dem Gewebe beeinflusst werden. In Kapitel 1 werden dazu die Wechselwirkungsprozesse zwischen Licht und Haut vorgestellt und die optischen Parameter der Haut diskutiert.⁴

Kapitel 2 beschäftigt sich mit den spektralen Eigenschaften von endogenen⁵ Chromophoren und exogenen Farbstoffen. Für quantitative Auswertungen wurden dabei die spektralen Eigenschaften sowie das Aggregations- und Adsorptionsverhalten von ICG und PpIX eingehend untersucht.

Bei der Interpretation der gemessenen Fluoreszenzintensitäten wird bisher von einem linearen Zusammenhang zwischen Farbstoffkonzentration und Fluoreszenzintensität ausgegangen. Durch Fluoreszenzlöschung und Reabsorption kann die Fluoreszenzintensität im Gewebe jedoch beeinflusst werden, sodass es zur Fehleinschätzung der Farbstoffkonzentration kommen kann. Für die beiden untersuchten Farbstoffe wird in Kapitel 3 die Größenordnung dieser Effekte abgeschätzt. Als Anwendungen der FD werden Untersuchungen zur Pharmakokinetik von ICG in Tumoren des Hamsters sowie zur Fluoreszenzkinetik von ALA-induzierten Porphyrinen in humanen Tumoren der Haut und die fluoreszenzgestützte Biopsie vorgestellt.

³von außen zugeführt

⁴Zum besseren Verständnis für Leser anderer Disziplinen sind medizinische Fachbegriffe und physikalische Abschnitte, die gewisse Vorkenntnisse voraussetzen, mit Fußnoten versehen.

⁵körpereigenen

Kapitel 1

Optik der Haut

Wird Licht zu diagnostischen oder therapeutischen Zwecken in der Medizin verwendet, sind die optischen Eigenschaften des jeweiligen Gewebes für die Lichtausbreitung entscheidend. Für die Fluoreszenzdiagnostik (FD) trifft dies in zweifacher Weise zu: Zum einen muss Licht in das Gewebe eindringen können, um die Farbstoffmoleküle zur Fluoreszenz anzuregen und zum anderen muss das emittierte Fluoreszenzlicht das Gewebe durchdringen können, damit es detektiert werden kann. Die optischen Eigenschaften der Haut unterscheiden sich in den einzelnen Hautschichten.

1.1 Aufbau der Haut

Die Haut des Menschen hat eine Fläche von $1,5\text{--}2\text{ m}^2$ und ist damit das größte Organ. Sie dient vorrangig dem mechanischen, chemischen und immunologischen Schutz des Körpers, aber auch als Sinnesorgan und zur Wärmeregulation.

Die Haut besteht aus mehreren Schichten, die abhängig von der Lokalisation unterschiedlich dick sein können. Von außen nach innen unterscheidet man *Epidermis* (Oberhaut), *Dermis* (Lederhaut) und *Subkutis* (Unterhautfettgewebe) (Abb. 1.1). Als Anhangsgebilde werden Haare, Nägel, Talg- und Schweißdrüsen bezeichnet. Die Blutgefäße der Haut gliedern sich in einen oberen, subepidermalen und einen tiefen, dermalen Gefäßplexus, die durch Arteriolen und Venolen verbunden sind.

Die äußerste Schicht der Haut wird vom *Stratum corneum* (Hornschicht) gebildet (Abb. 1.2). Ihr kommt beim Auftreffen von Licht auf die Haut als Grenzfläche eine besondere Bedeutung zu.¹

¹Das Stratum corneum wird aufgrund seiner Entstehung i. d. R. als Bestandteil der Epidermis

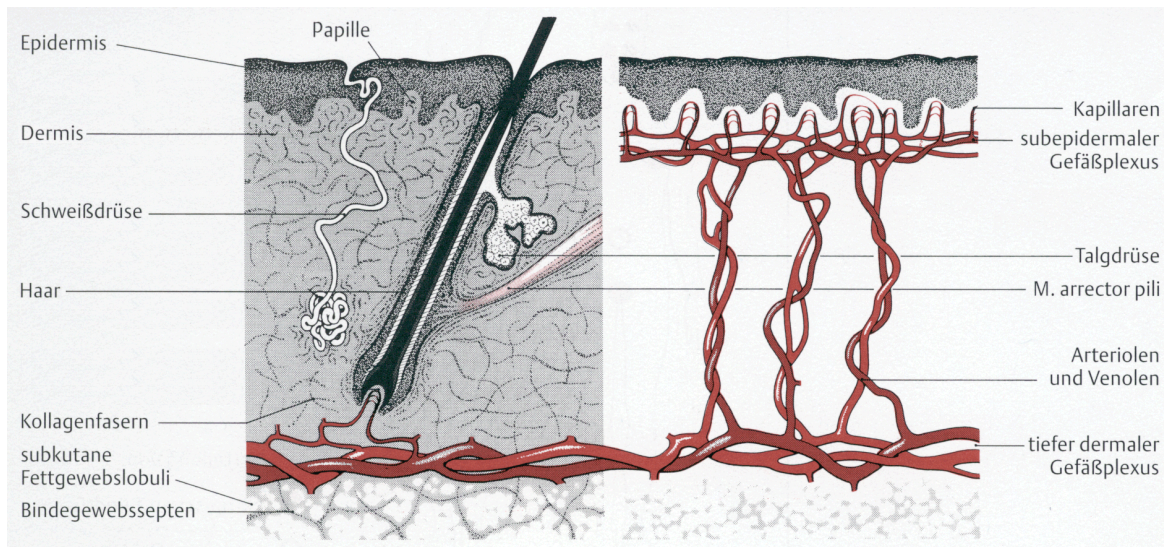


Abbildung 1.1: Schematischer Aufbau der Haut [Jun98].

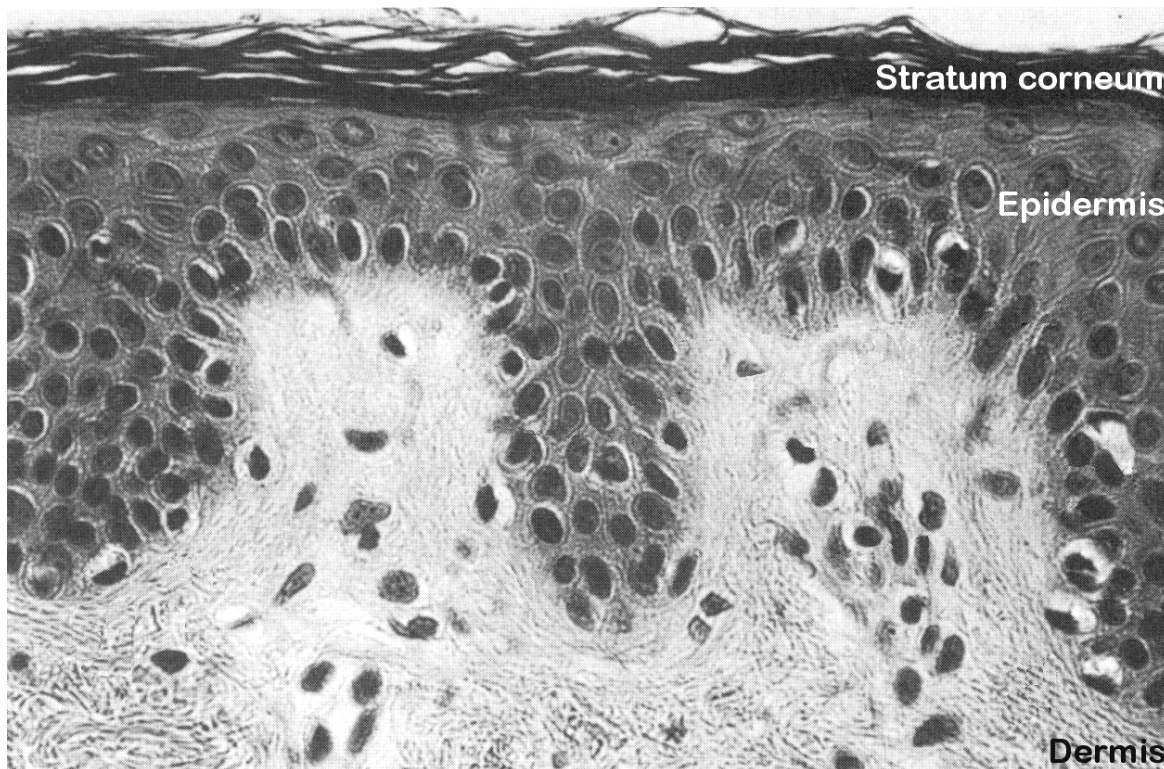


Abbildung 1.2: Histologischer Schnitt durch die oberen Schichten der Haut; HE-Färbung; 45-fach vergrößert [Fri98].

Stratum corneum: Das Stratum corneum ist etwa 8–15 μm dick und besteht aus 10–20 Lagen fest gepackter, flacher, plättchenartiger, kernloser *Korneozyten* (Hornzellen) [YST99].² Die Korneozyten sind dicht gefüllt mit Keratinfilamenten und durch einen Lipidfilm, der die Haut vor dem Austrocknen schützt, getrennt.

Epidermis: Die Epidermis ist ein mehrschichtiges Plattenepithel, das zu 90 % aus *Keratinozyten* besteht und für die mechanische Widerstandsfähigkeit der Haut verantwortlich ist. Die Gesamtdicke dieser Schicht beträgt etwa 60–180 μm . Ausgehend vom *Stratum basale*, das aus einer einzigen Lage von Basalzellen (Stammzellen) gebildet wird und auf der Basalmembran aufsitzt, werden durch Zellteilung neue Keratinozyten erzeugt. Diese verändern mit der Zeit ihre Gestalt (Basalzelle, Stachelzelle, Körnerzelle, Hornzelle) und durchwandern so das *Stratum spinosum* und *Stratum granulosum* bis sie schließlich absterben und das Stratum corneum bilden.³

Ebenfalls meist auf der Basalmembran aufsitzend und mit langen Dendritfortsätzen ausgestattet befinden sich die *Melanozyten*. Die Melanozyten produzieren als Antwort auf physiologische und pathologische Reize (insbesondere UV-Licht) das Pigment Melanin, das über die Dendritfortsätze in Form von Melanosomen in die benachbarten Keratinozyten transferiert wird und damit hauptverantwortlich für die Eigenfarbe der Haut ist.

Dermis: Die Dermis ist etwa 1–4 mm dick und besteht überwiegend aus Bindegewebe. Sie hat komplexe biologische Aufgaben (v. a. Ernährung der Epidermis, Bereitstellung von Abwehrzellen) und ist zudem für die mechanische Festigkeit der Haut verantwortlich. Sie gliedert sich in ein dünnes, zell- und gefäßreiches *Stratum papillare* und in ein dickes, faserreiches *Stratum reticulare*.

Das Stratum papillare besteht aus einem lockeren Geflecht von Kollagenfasern und zahlreichen *Fibroblasten*⁴ und streckt fingerförmige Ausläufer (Papillen) gegen die

gesehen; wegen der unterschiedlichen strukturellen und damit verbundenen optischen Eigenschaften erscheint das Stratum corneum im Lichtmikroskop jedoch als eigenständige Schicht (s. Abb. 1.2).

²An der Handinnenseite, Fußsohle und Ferse ist das Stratum corneum sehr viel deutlicher ausgeprägt, besteht aus 50–90 Zellschichten und ist bis zu 200 μm dick.

³Die Mutation der Gestalt heißt *epidermale Differenzierung* und läuft vor allem im oberen Stratum granulosum ab: Abplattung der Zellen, Verschwinden der Zellkerne und Zellorganellen, Dehydratation, Ausbildung einer zementartigen Lipidsubstanz im Interzellularraum und schließlich die Verhornung [Fri98]; die Turnover-Zeit von der Basalschicht zum Stratum granulosum beträgt normalerweise 2–3 Wochen, vom Stratum granulosum bis zur Hornschuppe nochmals 2 Wochen [Jun98].

⁴Die eingelagerten Fibroblasten produzieren die für den Bindegewebsaufbau notwendigen Proteine wie Kollagen und Elastin.

Epidermis vor, die je eine Kapillarschlinge enthalten und so die Epidermis versorgen. Das Stratum papillare beherbergt zudem perivascular⁵ angeordnete Mastzellen und Lymphozyten, die in erster Linie der Immunabwehr dienen, sowie vereinzelt Melanozyten. Die Lymphgefäße der Dermis beginnen blind und sind für den Abtransport von Zellrückständen und Flüssigkeit zuständig. Ein feines Geflecht von Kollagenfibrillen sorgt an der Grenze von Epidermis und Dermis, der sog. Junktionszone für eine sichere Verbindung.

Im Stratum reticulare sind die Kollagenfasern deutlich verdickt und als Faserbündeln, in Form eines Scherengitters angeordnet. Zusammen mit dem dazwischenliegenden Netz aus elastischen Fasern verleiht dies der Haut eine gewisse Dehnfähigkeit und Elastizität. Das Stratum reticulare enthält zudem Nerven und Blutgefäße, die den tiefen und subepidermalen Plexus verbinden, sowie Hautanhangsgebilde.

Subkutis: Die Subkutis dient der Energiespeicherung, Wärmeisolation und an manchen Stellen der mechanischen Polsterung. Die Subkutis besteht aus Fettgewebsläppchen (Lobuli), die durch bindegewebige Septen getrennt sind.

1.2 Wechselwirkungen zwischen Licht und Haut

Trifft ein Lichtstrahl⁶ auf die Haut, so wird ein geringer Anteil des Lichts wegen des Brechungsindexunterschieds zwischen Luft und Stratum corneum reflektiert (Abb. 1.3). Das restliche Licht wird gebrochen und dringt in die Haut ein. Hier kann es absorbiert oder gestreut werden. Rückgestreutes Licht, das die Haut wieder verlassen kann wird als Remission bezeichnet. Auch im Gewebe entstandenes Fluoreszenzlicht kann auf seinem Weg aus dem Gewebe absorbiert oder gestreut werden.

⁵um die Blutgefäße herum

⁶In der geometrischen Optik, die für die folgenden Erklärungen als Grundlage dienen soll, wird der Begriff „Lichtstrahl“ dazu verwendet, um die Richtung des *Energieflusses* zu beschreiben. In der Sprechweise der elektromagnetischen Theorie ist also ein Lichtstrahl mit der Richtung des Poynting-Vektors \vec{S} gleichzusetzen. Da für optisch isotrope Medien der Poynting-Vektor \vec{S} und der sonst in der elektromagnetischen Theorie zur Beschreibung von Licht übliche Wellenvektor \vec{k} die gleiche Richtung besitzen, kann man beide Sprechweisen analog benutzen ohne etwas an den physikalischen Gesetzmäßigkeiten zu verändern [ZK96].

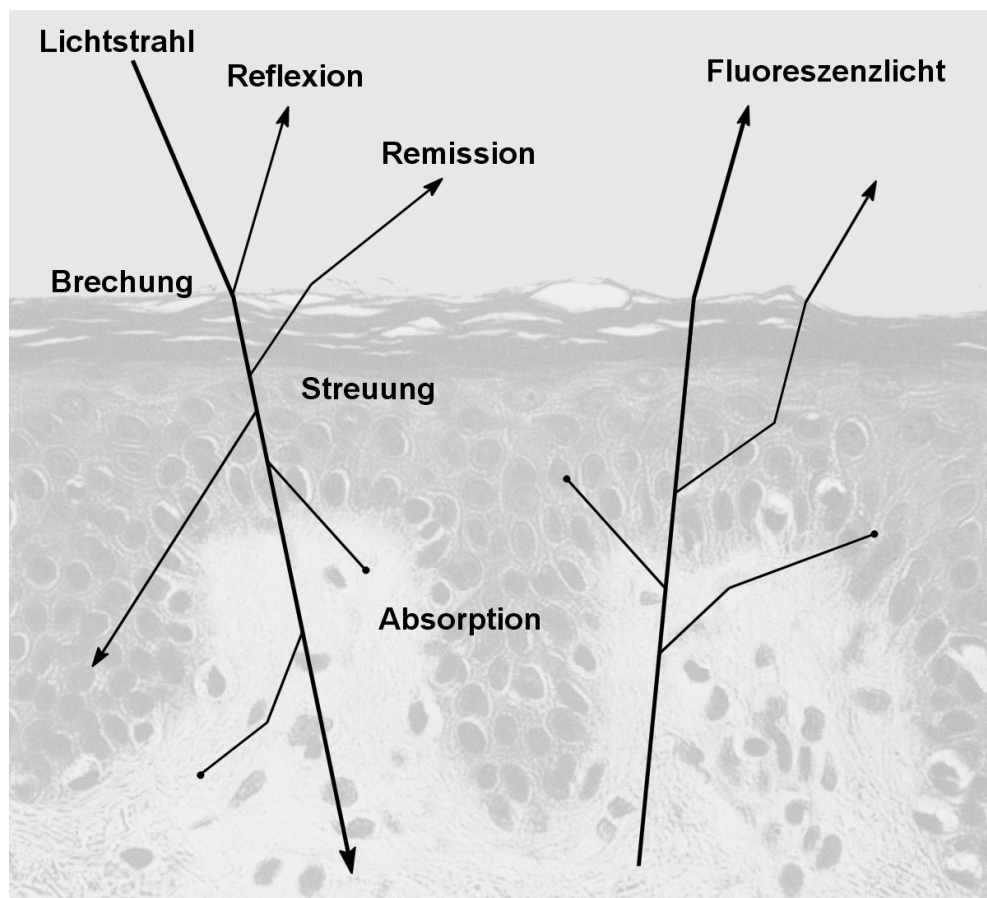


Abbildung 1.3: Mögliche Wechselwirkungen zwischen Licht und Haut.

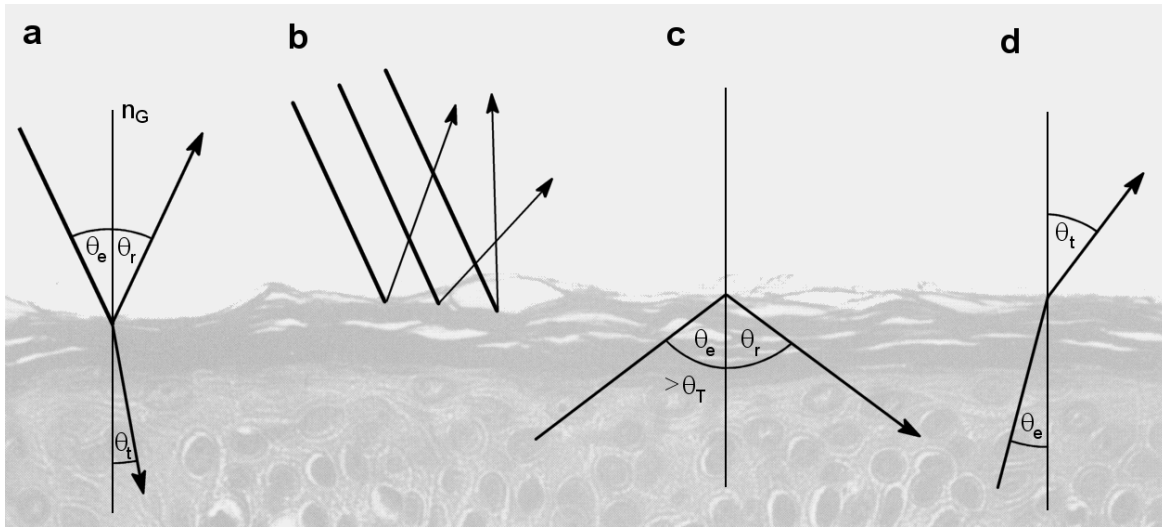


Abbildung 1.4: Reflexion und Brechung von Licht an der Haut.

1.2.1 Reflexion

Reflexion tritt immer dann auf, wenn sich der Brechungsindex auf dem Weg des Lichtstrahls ändert. Dies ist insbesondere beim Übergang von einem Medium in ein anderes gegeben. Das Licht wird dann an der Grenzfläche der beiden Medien gemäß dem *Reflexionsgesetz* reflektiert (Abb. 1.4 a):

Licht wird an Grenzflächen so reflektiert, dass der reflektierte Strahl in der Einfallsebene liegt und Ausfallswinkel θ_r gleich Einfallswinkel θ_e ist.

Ein- und Ausfallswinkel werden durch die Normale zur Grenzfläche \vec{n}_G (Lot) und einfallenden bzw. reflektierten Strahl festgelegt. Da die Oberfläche der Haut nicht glatt und eben ist, werden parallel einfallende Lichtstrahlen unter verschiedenen Winkeln reflektiert (Abb. 1.4 b). Neben der gerichteten Reflexion (Glanzlichter) beobachtet man daher einen erheblichen Anteil an diffuser Reflexion.

Der Anteil des reflektierten Lichts (Reflexionsgrad) ist umso größer, je größer die Änderung im Brechungsindex zwischen den beiden Medien ist. Für den Übergang von einem Medium mit Brechungsindex n_e in ein Medium mit Brechungsindex n_t gilt für den Reflexionsgrad R bei senkrechtem Einfall des Lichts ($\theta_e = \theta_r = 0$) auf die Grenzschicht:⁷

⁷Korrektweise muss an dieser Stelle erwähnt werden, dass die folgenden Betrachtungen zur Reflexion nur für den Fall von transparenten Medien exakt gültig sind. Besitzen die Medien eine nicht zu vernachlässigende Absorption, wird der Reflexionskoeffizient \mathbf{r} komplex und der Reflexionsgrad R entspricht dann dem Quadrat des Betrages von \mathbf{r} , also $R = |\mathbf{r}|^2 = \mathbf{r}\mathbf{r}^*$ [ZK96].

$$R = \frac{(n_e - n_t)^2}{(n_e + n_t)^2} \quad (1.1)$$

Für den Übergang von Luft ($n = 1$) in Haut ($n \approx 1,5$; s. Abschnitt 1.3) erhält man damit einen Reflexionsgrad von $R = 4\%$. Wegen der Quadrate in Gl. (1.1) ist es unwichtig, von welcher Seite her das Licht auf die Grenzfläche fällt. Der Reflexionsgrad ist für beide Fälle identisch. Austretendes Fluoreszenzlicht wird bei senkrechtem Auftreffen auf die Grenzschicht also auch zu 4% in die Haut zurückreflektiert.

Zur Behandlung des allgemeinen Falles eines beliebigen Einfallswinkel θ_e muss man das elektrische Feld in seine Komponenten parallel und senkrecht zur Einfallsebene aufspalten [Hec89]. Dadurch lassen sich die Reflexionskoeffizienten der Feldkomponenten parallel (\mathbf{r}_{\parallel}) und senkrecht (\mathbf{r}_{\perp}) zur Einfallsebene in den sog. *Fresnel-Gleichungen* ausdrücken:

$$\mathbf{r}_{\perp} = \frac{E_{r\perp}}{E_{e\perp}} = \frac{n_e \cos \theta_e - n_t \cos \theta_t}{n_e \cos \theta_e + n_t \cos \theta_t} = -\frac{\sin(\theta_e - \theta_t)}{\sin(\theta_e + \theta_t)} \quad (1.2)$$

$$\mathbf{r}_{\parallel} = \frac{E_{r\parallel}}{E_{e\parallel}} = \frac{n_t \cos \theta_e - n_e \cos \theta_t}{n_t \cos \theta_e + n_e \cos \theta_t} = \frac{\tan(\theta_e - \theta_t)}{\tan(\theta_e + \theta_t)} \quad (1.3)$$

Mithilfe der Fresnel-Gleichungen (1.2) und (1.3) kann man jetzt den Reflexionsgrad $R = |\mathbf{r}|^2$ berechnen. Im Gegensatz zum Spezialfall des senkrechten Einfalls muss im allgemeinen Fall die Seite, aus der das Licht auf die Grenzfläche fällt, beachtet werden.

Reflexionsgrad bei Einfall aus dem optisch dünneren Medium

Wenn das Licht aus dem optisch dünneren Medium auf die Grenzfläche trifft ($n_e < n_t$), wie dies bei der FD zur Anregung der Farbstoffe oder in der Lasertherapie der Fall ist, ergibt sich für einen relativen Brechungsindex $n_t/n_e = 1,5$ der in Abb. 1.5 (links) gezeigte Verlauf.

Für Licht, das senkrecht zur Einfallsebene polarisiert ist, steigt die Reflexion (R_{\perp}) vom Wert $R_{\perp}(\theta_e = 0^\circ) = 0,04$ stetig an bis für $\theta_e = 90^\circ$ der Wert $R_{\perp} = 1$ erreicht wird. Ist das Licht parallel zur Einfallsebene polarisiert, beobachtet man zunächst eine Abnahme der Reflexion; R_{\parallel} verschwindet schließlich ganz, wenn der Einfallswinkel einen bestimmten Wert, den *Brewsterwinkel* θ_B erreicht. Danach steigt R_{\parallel} stetig an, bis $R_{\parallel}(\theta_e = 90^\circ) = 1$ erreicht wird.

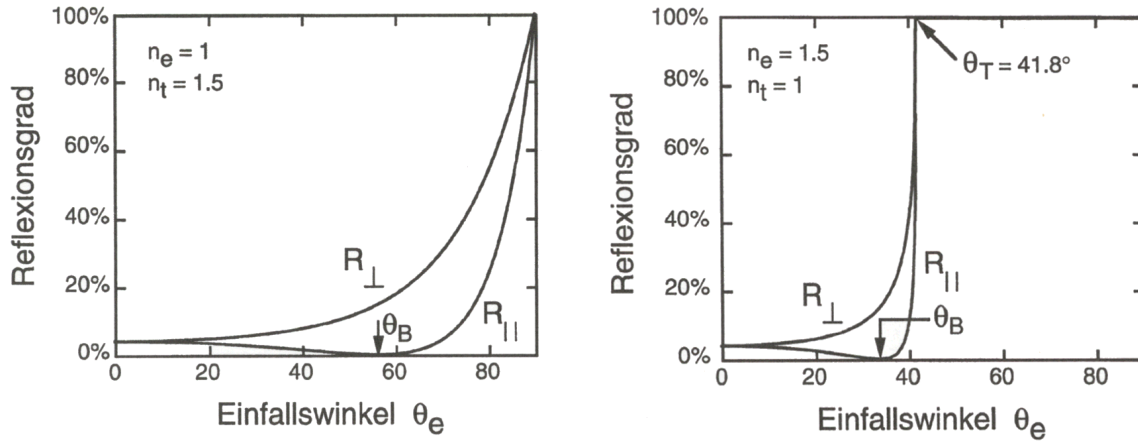


Abbildung 1.5: Abhängigkeit des Reflexionsgrades R vom Einfallswinkel θ_e für Licht, das parallel (R_{\parallel}) bzw. senkrecht (R_{\perp}) zur Einfallsebene polarisiert ist. **Links** für den Einfall aus dem optisch dünneren Medium ($n_e < n_t$); beim Brewsterwinkel θ_B verschwindet das Reflexionsvermögen R_{\parallel} . **Rechts** für den Einfall aus dem optisch dichteren Medium ($n_e > n_t$); bei Einfallswinkeln, die größer als der Totalreflexionswinkel θ_T sind gilt $R_{\parallel} = R_{\perp} = 100\%$ [ZK96].

R_{\parallel} verschwindet genau dann, wenn der Nenner in Gl. (1.3) divergiert; dies ist für $\theta_e + \theta_t = 90^\circ$ der Fall. Mithilfe dieser Bedingung und des Brechungsgesetzes (s. Abschnitt 1.2.2) lässt sich der Brewsterwinkel berechnen:

$$\theta_B = \arctan\left(\frac{n_t}{n_e}\right) \quad \text{Brewsterwinkel} \quad (1.4)$$

Nimmt man für die Reflexion von parallel zur Einfallsebene polarisiertem Licht an der Hautoberfläche wieder einen relativen Brechungsindex von $n_t/n_e = 1,5$ an, verschwindet das Reflexionsvermögen für $\theta_B = 56,3^\circ$. Der gebrochene und der reflektierte Strahl stehen dann senkrecht aufeinander.⁸

Reflexionsgrad bei Einfall aus dem optisch dichteren Medium

Fällt Licht aus dem optisch dichteren Medium auf die Grenzfläche ($n_e > n_t$), beobachtet man, dass bereits für Einfallswinkel $\theta_e = \theta_T < 90^\circ$ das Reflexionsvermögen R

⁸In der Praxis nützt man das Verschwinden der Reflexion am Brewsterwinkel aus, wenn polarisiertes Licht durch viele Oberflächen ohne Reflexionsverluste transmittiert werden soll (sog. Brewsterfenster, z. B. in Lasern) oder wenn mit einfachen Mitteln polarisiertes Licht, d. h. Licht mit definierter Richtung des elektrischen Feldvektors \vec{E} , hergestellt werden soll [ZK96].

zu 100 % wird (Abb. 1.5 (rechts)). Der Winkel θ_T wird als *Totalreflexionswinkel* bezeichnet und ist gerade der Winkel, bei dem sich das gebrochene Licht parallel zur Grenzfläche ausbreitet (s. Abschnitt 1.2.2). Mithilfe des Brechungsgesetzes läßt sich θ_T herleiten und man erhält:

$$\theta_T = \arcsin\left(\frac{n_t}{n_e}\right) \quad \text{Winkel der Totalreflexion} \quad (1.5)$$

Für den Fall, dass im Gewebe entstandenes Fluoreszenzlicht oder diffuses, rückgestreutes Anregungslicht aus dem Gewebe heraus auf die Hautoberfläche trifft, erhält man für $n_e/n_t = 1,5$ einen Totalreflexionswinkel von $41,8^\circ$. Für Einfallswinkel $\theta_e > \theta_T$ bleibt $R_\perp = R_\parallel = 1$ und das Licht wird ohne Intensitätsverluste an der Grenzfläche reflektiert (Abb. 1.4 c).⁹

1.2.2 Brechung

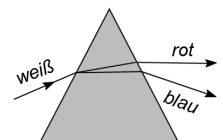
Dasjenige Licht, das an der Hautoberfläche nicht reflektiert wird (also etwa 96 %), dringt in das Gewebe ein. Aufgrund der Stetigkeit von transversaler und longitudinaler Komponenten des elektromagnetischen Feldes und der Dispersionsrelation¹⁰ tritt beim Übergang jedoch Brechung ein (Abb. 1.4 a). Die Stärke der Brechung hängt auch hier vom Unterschied im Brechungsindex zwischen den beiden Medien ab und lässt sich in Form des *Snelliusschen Brechungsgesetzes* formulieren:

⁹Da Licht durch Totalreflexion verlustfrei abgelenkt werden kann, benutzt man v.a. in der Lasertechnik zur Lichtreflexion Prismen anstatt Spiegeln. Im Gegensatz zu den aufgedampften Silberschichten der Spiegel, die Absorptionsverluste von etwa 2–3 % aufweisen, können die an den Ein- und Austrittsflächen eines Prismas auftretenden Reflexionsverluste durch dielektrische Antireflexschichten praktisch vollständig eliminiert werden [ZK96].

Eine besonders wichtige Anwendung hat die Totalreflexion im Zusammenhang mit der Lichtübertragung in Glasfasern (Lichtleitern) erlangt; hier wird mithilfe eines transparenten, flexiblen Glaskerns und eines etwas optisch dünneren Mantels das Licht durch Totalreflexion über sehr große Entfernungen (z. B. in der Nachrichtentechnik) oder auch „um die Ecke“ (insb. bei medizinischen Anwendungen, z. B. der *in vivo*-Spektroskopie) geleitet.

¹⁰In durchsichtigen Körpern ist die Lichtgeschwindigkeit c kleiner als im Vakuum und hängt von der Frequenz ab. Die daraus folgende Abhängigkeit der Brechzahl n eines Körpers von der Frequenz nennt man *Dispersion*.

Ein weißer Lichtstrahl wird infolge der Dispersion beim Durchgang durch ein Prisma in seine Spektralfarben zerlegt, da diese zweimal verschieden stark gebrochen werden (Abb.). I. d. R. wird blaues Licht stärker gebrochen als rotes (normale Dispersion).



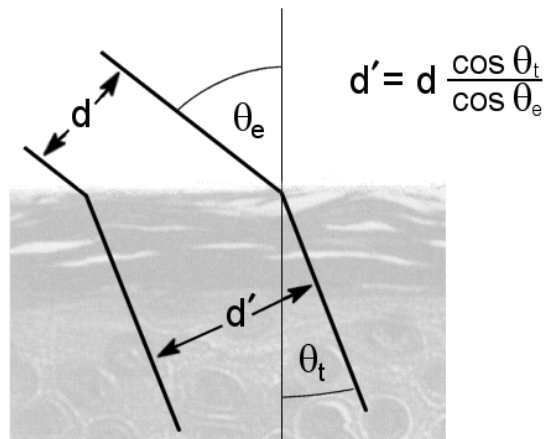


Abbildung 1.6: Änderung des Strahlquerschnitts bei Brechung.

Licht wird an Grenzflächen so gebrochen, dass der transmittierte Strahl in der Einfallsebene liegt und für den Transmissionswinkel θ_t folgende Beziehung gilt:

$$n_e \sin \theta_e = n_t \sin \theta_t \quad \text{Snelliussches Brechungsgesetz} \quad (1.6)$$

Zu beachten ist hierbei, dass die Brechung bei Einfall vom optisch dünneren Medium (z. B. Luft) zum Lot hin erfolgt (Abb. 1.4 a), während bei Einfall vom optisch dichteren Medium (z. B. Haut) der Strahl vom Lot weg gebrochen wird (Abb. 1.4 d). Bei der zweiten Variante können dabei aber nur solche Einfallswinkel θ_e auftreten, die kleiner sind als der Winkel für Totalreflexion θ_T . Im Grenzfall ($\theta_e = \theta_T$) wird der Strahl so gebrochen, dass er genau in der Grenzschicht verläuft ($\theta_t = 90^\circ$). Für noch größere Winkel tritt Totalreflexion ein.

Aufgrund der Brechung wird ein kollimierter Strahl, der (vom optisch dünneren Medium) schräg auf die Grenzfläche fällt aufgeweitet (Abb. 1.6). Dadurch nimmt die Energiedichte im Strahl ab. Im umgekehrten Fall wird (vom optisch dichteren Medium) heraustretendes Licht im Querschnitt verringert. Die Stärke der Aufweitung/Verringerung hängt vom Einfallswinkel θ_e und den Brechungsindizes n_e und n_t der Medien ab.

Die raue Oberfläche der Haut verursacht nicht nur eine diffuse Reflexion, sondern ebenso eine diffuse Brechung des Lichts. Ein kollimiertes, paralleles Strahlenbündel wird durch die raue Oberfläche unter verschiedenen Transmissionswinkeln θ_t gebrochen, was eine Durchmischung der Strahlrichtungen und damit diffuseres Licht zur Folge hat.¹¹

¹¹Das „Diffuserwerden“ des Lichts beim Eintritt in die Haut ist vergleichbar mit dem Durchgang von Licht durch geätztes (aufgerauchtes) Glas im Gegensatz zu poliertem Glas. Während man Objekte

1.2.3 Remission

Als Remission wird hier dasjenige Licht bezeichnet, das nach Eindringen in das Gewebe dieses wieder verlassen konnte.¹² Je nach Herkunft der Strahlung kann man epidermale und dermale Remission unterscheiden.

Die Remission darf nicht mit der Fluoreszenz verwechselt werden. Wegen der *Stokes-schen Verschiebung* hat die Fluoreszenz meist eine größere Wellenlänge als das Anregungslicht,¹³ wobei es durch die Verbreiterung der Absorptions- und Emissionsbanden zur Überlappung der beiden Spektren kommen kann.

Die Remission wird in überwiegendem Maße durch rückgestreutes Licht, das an Streuzentren in der Dermis entsteht, verursacht. Ein sehr kleiner Anteil wird durch reflektiertes Licht, das durch Unterschiede im Brechungsindex zwischen den einzelnen Hautschichten entsteht, hervorgerufen. Deshalb ist die Remission in ähnlicher Weise wie die Streuung von der Wellenlänge abhängig.

Schicht-Modell der Haut

Eine mathematische Behandlung der Remission kann mithilfe eines 2-Schicht-Modells der Haut erfolgen [WAP81]. Darin betrachtet man eine Hautprobe, die aus zwei unterschiedlichen Schichten (z. B. Epidermis und Dermis) aufgebaut ist (Abb. 1.7).

Als Annahmen für das 2-Schicht-Modell werden vorausgesetzt, dass die Absorption und Streuung innerhalb der Schichten konstant sind und sich nur die Schichten untereinander unterscheiden dürfen. Mit R_1 , R_2 und T_1 , T_2 werden die Remission bzw. Transmission von Schicht 1 und Schicht 2 bezeichnet, wenn beide Schichten voneinander getrennt sind. Die Reflexion an den Grenzflächen aufgrund der Brechungs-

durch poliertes Glas sehr gut erkennen kann, nimmt man sie durch geätztes Glas nur schemenhaft wahr.

¹²In den meisten Fällen wird in der Literatur alles Licht, das in irgendeiner Form zurückkommt als Reflexion bezeichnet. Zur Unterscheidung des an der Oberfläche reflektierten Anteils vom übrigen, aus dem Gewebe emittierten Licht wird ersteres als *Fresnel-Reflexion* und alles andere als *diffuse Reflexion* bezeichnet. Hierbei muss erwähnt werden, dass auch die Fresnel-Reflexion diffus sein kann und dies in der Regel auch ist (s. Abschnitt 1.2.1).

¹³Seltene Ausnahmen vom *Stokes-schen Gesetz*, dass Fluoreszenzlicht wegen der Energieerhaltung immer längerwelliger und damit energieärmer als das Anregungslicht sein muss, verstoßen dennoch nicht gegen den Energieerhaltungssatz: die fehlende Energie wird dann aus anderweitigen Energiequellen (z. B. Wärmereservoir) geliefert [BS87]; eine andere Möglichkeit ist die *Zwei-Photonen-Absorption*, bei der zwei Lichtquanten der Frequenz ω gleichzeitig absorbiert werden und im Atom/Molekül einen Übergang der Energie $2\hbar\omega$ bewirken [SMS00].

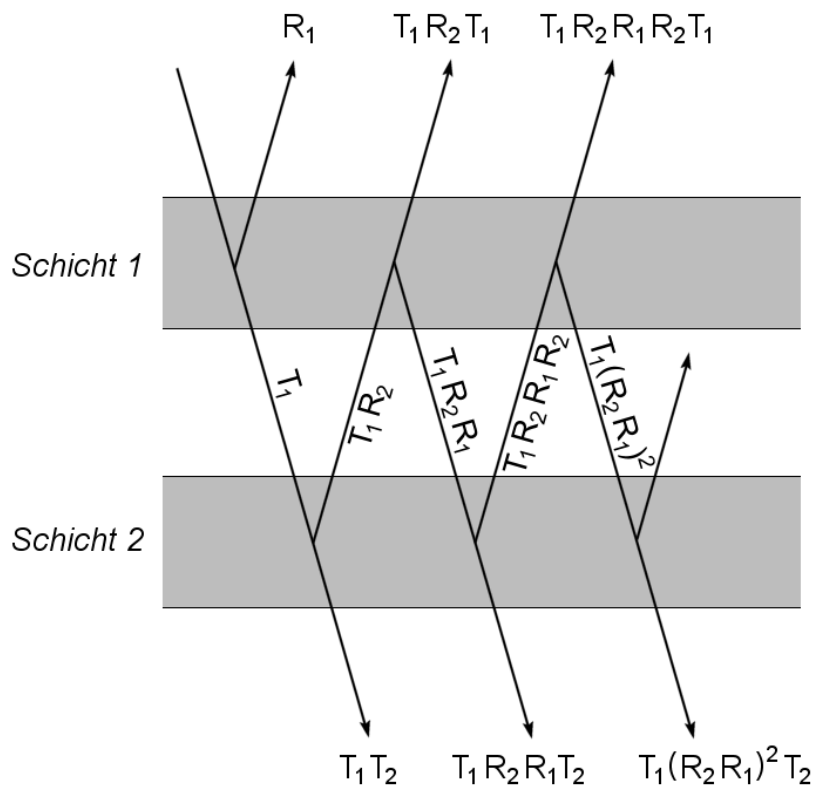


Abbildung 1.7: 2-Schicht-Modell der Haut zur mathematischen Behandlung von Reflexion und Transmission [WAP81]. Der Bereich zwischen den Schichten wurde der Anschaulichkeit wegen eingefügt (Erklärungen siehe Text).

der Änderung sei vernachlässigt. Desweiteren werden mit R_{12} und T_{12} die Remission bzw. Transmission der zusammengesetzten Schichten bezeichnet.

Fällt nun Licht von oben auf die beiden Schichten ein, wird von Schicht 1 der Anteil R_1 remittiert und T_1 transmittiert. Der transmittierte Anteil T_1 trifft daraufhin auf Schicht 2; hier wird ebenfalls ein Teil remittiert ($T_1 R_2$) und ein Teil ($T_1 T_2$) transmittiert. Das remittierte Licht $T_1 R_2$ trifft erneut auf die erste Schicht und wird wieder zu einem Teil ($T_1 R_2 R_1$) remittiert und zu einem Teil ($T_1 R_2 T_1$) transmittiert. Durch sukzessives Anwenden dieser Regeln kann man die gesamte Remission R_{12} wie folgt ausdrücken:

$$\begin{aligned} R_{12} &= R_1 + T_1^2 R_2 + T_1^2 R_2 R_1 R_2 + T_1^2 R_2 (R_1 R_2)^2 + \dots \\ &= R_1 + \frac{T_1^2 R_2}{1 - R_1 R_2} \end{aligned} \quad (1.7)$$

Analog erhält man für die gesamte Transmission T_{12} durch die beiden Schichten

$$T_{12} = \frac{T_1 T_2}{1 - R_1 R_2} \quad (1.8)$$

Durch separate Messung von R_1 , R_2 und T_1 , T_2 an den einzelnen Schichten lässt sich mithilfe der Gl. (1.7) und (1.8) die gesamte Remission R_{12} bzw. Transmission T_{12} der Probe abschätzen und mit den experimentellen Werten vergleichen. Dabei stellt man eine sehr gute Übereinstimmung vom ultravioletten bis zum nahen infraroten Bereich des Spektrums fest [WAP81], was die Gültigkeit des Modells zeigt.

1.2.4 Extinktion

Bleibt die Intensität I eines Lichtstrahls beim Durchgang durch ein Medium unverändert, dann heißt das Medium durchlässig, im sichtbaren Teil des Spektrums auch durchsichtig; nimmt die Intensität ab, so spricht man allgemein von *Extinktion* (=Auslöschung) [BS87]. Die Extinktion von Licht kann zwei Ursachen haben: *Absorption* und *Streuung*.

Absorption: Das Licht wird von den Atomen/Molekülen des Mediums absorbiert, d. h. „verschluckt“. Dabei werden die Atome/Moleküle in einen energetisch höheren Zustand angeregt und die absorbierte Energie als Wärme oder Fluoreszenzlicht abgegeben (s. Abschnitt 2.2.3).

Streuung: Das Licht wird von den Bestandteilen des Mediums gestreut, d. h. von der ursprünglichen Richtung abgelenkt. Streuende Bestandteile eines Mediums können z. B. Staubteilchen in der Luft (\rightarrow Himmelsblau), Schwebestoffe im Wasser oder die Proteine der Zellen sein. Da die Haut sehr heterogen und zudem aus unterschiedlich großen Bestandteilen aufgebaut ist, gibt es innerhalb der Haut auch sehr unterschiedliche Streumechanismen.

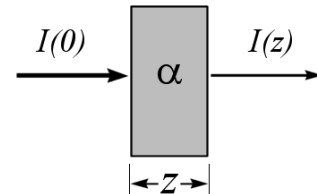
In der Haut erfolgt die Extinktion von Licht größtenteils durch Streuung; da die Epidermis relativ dünn ist, wird die beobachtete Streuung in erster Linie durch die Dermis verursacht; das Melanin der Epidermis absorbiert insbesondere den gefährlichen UV-Anteil im Sonnenlicht.

Lambert-Beersches Gesetz

Bei der Extinktion von Licht ist die Abnahme der Intensität dI proportional zur Wegstrecke z im Medium und zur Intensität I des einstrahlenden Lichts. Die Proportionalitätskonstante α bezeichnet man als *Extinktions-* oder *Schwächungskoeffizient*:

$$dI = -\alpha z I \quad \alpha = \text{Extinktionskoeffizient, } (\alpha > 0) \quad (1.9)$$

Durch Integration von Gl. (1.9) erhält man das *Lambert-Beersche Gesetz*, das das exponentielle Abklingen der ursprünglichen Intensität $I(0)$ beim Durchgang durch das Medium beschreibt (Abb.):



$$I(z) = I(0) e^{-\alpha z} \quad \text{Lambert-Beersches Gesetz} \quad (1.10)$$

In der praktischen Anwendung werden in Zusammenhang mit der Extinktion von Licht unterschiedliche Begriffe verwendet, die im folgenden Abschnitt anhand der Absorption erklärt werden sollen.

1.2.5 Absorption

Bei nicht-streuenden Medien (z. B. Lösungen) ist die Extinktion ausschließlich auf die Absorption zurückzuführen. Die Größe α wird dann als *Absorptionskoeffizient* bezeichnet. Da αz in Gl. (1.10) dimensionslos sein muss, hat α die Dimension einer reziproken

Länge (z. B. cm^{-1}). Seine physikalische Bedeutung ist die der reziproken Strecke, auf der die Lichtintensität durch Absorption auf den e -ten Teil geschwächt wird. Der Absorptionskoeffizient α ist abhängig von der Wellenlänge λ und charakteristisch für das absorbierende Medium. Absorptionsspektren $\alpha(\lambda)$ der wichtigsten endogenen Chromophore der Haut und exogener Farbstoffe werden in Kapitel 2 dargestellt.

Da die Absorption längs des Weges z nur von der Gesamtzahl der im Strahlengang befindlichen absorbierenden Atome/Moleküle abhängt, kann man bei bekannter Konzentration c der absorbierenden Zentren das Lambert-Beersche Gesetz auch in folgender Form schreiben:

$$I(z) = I(0) e^{-\alpha c z} = I(0) \cdot 10^{-\epsilon c z} \quad (1.11)$$

Hierbei wird α als *molarer Absorptionskoeffizient* und ϵ meist als *molarer (dekadischer) Extinktionskoeffizient* bezeichnet. Da c die Dimension Teilchen pro Volumen (z. B. mol/Liter) hat, werden sowohl α wie auch ϵ in der Einheit $\text{Liter mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$ angegeben. Aus Gl. (1.11) ergibt sich auch die Beziehung: $\alpha = \epsilon \cdot \ln 10$.

Für das Produkt $\epsilon c z$ wird oft der Ausdruck *optische Dichte* verwendet. Die optische Dichte D ist dimensionslos und kann mit Spektrometern direkt gemessen werden.¹⁴

$$D = \epsilon c z \quad (1.12)$$

Um die Eigenschaften der einzelnen Atome aus denen der makroskopischen Probe herauszuheben kann man die in Gl. (1.11) bereits enthaltene Teilchendichte explizit angeben; dies führt zum Begriff des *Absorptionsquerschnitts* σ :

$$I(z) = I(0) e^{-\sigma c z N_A} \quad (1.13)$$

Der Absorptionsquerschnitt σ wird meist in der Einheit cm^2 angegeben und ist physikalisch zu deuten als derjenige Durchmesser eines Atoms/Moleküls, den ein Photon beim Anflug auf dieses Atom/Molekül „sieht“. N_A ist die Avogadro-Konstante und bezeichnet die Zahl der Atome in einem Mol ($N_A = 6,022 \times 10^{23} \text{mol}^{-1}$).

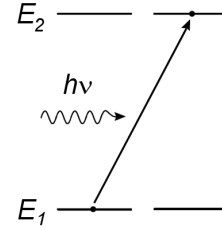
¹⁴Bei der Lichtübertragung durch Glasfasern wird neben der optischen Dichte auch der Begriff *Dämpfung* β in Einheiten von dB/km verwendet. Hier ist z in Einheiten von 10 km einzusetzen:

$$I(z) = I(0) \cdot 10^{-\beta z} \quad \beta = \text{Dämpfung (dB/km)}$$

Physikalische und mathematische Erklärung

Anschaulich kann die Absorption von Licht (Photonen) mit dem Übergang von Atomen/Molekülen von einem Energiezustand E_1 in einen energetisch höheren Zustand E_2 erklärt werden (Abb.).

Dabei verschwindet ein Photon der Energie $E = E_2 - E_1 = h\nu$ aus dem Strahlungsfeld. Die Wahrscheinlichkeit für die Absorption des Photons ist hierbei proportional zur Besetzungszahl des Niveaus E_1 .



Rein formal ergibt sich die Absorption durch die Einführung eines komplexen Brechungsindex¹⁵ $n = n_R + in_I$. Unter Verwendung der Beziehung $k = n\omega/c$ für den Wellenvektor k , die sich aus der Dispersionsrelation ergibt (ω ist die Kreisfrequenz,¹⁶ c ist die Lichtgeschwindigkeit), erhält man für die Ausbreitung einer ebenen Welle $E(z, t)$ in z -Richtung:

$$\begin{aligned}
 E(z, t) &= E_0 \exp[i\omega t - i k z] & (1.14) \\
 &= E_0 \exp\left[i\omega t - i \frac{\omega n_R}{c} z + \frac{\omega n_I}{c} z\right] \\
 &= \underbrace{E_0 \exp\left[\frac{\omega n_I}{c} z\right]}_{\text{Amplitude}} \exp\left[i\omega t - i \frac{\omega n_R}{c} z\right]
 \end{aligned}$$

Das elektrische Feld $E(z, t)$ besitzt dann einen schnell oszillierenden Anteil, dessen Wellenlänge im Medium durch den Realteil n_R des Brechungsindex bestimmt ist. Die Amplitude der Welle enthält neben dem Imaginärteil n_I des Brechungsindex auch eine z -Abhängigkeit. Da i. A. $n_I < 0$ gilt, nimmt die Feldstärke mit zunehmender Schichtdicke z des Mediums exponentiell ab; das Licht wird absorbiert.¹⁷

¹⁵In der Literatur wird für den komplexen Brechungsindex auch die Schreibweise $n = n_R(1 - i\kappa)$ verwendet. In diesem Fall ist κ im allgemeinen eine positive Größe, $\kappa = -n_I/n_R$.

¹⁶Die Kreisfrequenz ω ist mit der Frequenz ν des Lichts über die Beziehung $\nu = \omega/2\pi$ verknüpft; die Wellenlänge λ erhält man gemäß $\lambda = 2\pi c/\omega = c/\nu$.

¹⁷In allen Systemen, die sich im thermischen Gleichgewicht befinden, ist n_I stets negativ. Man erhält dann immer eine Abnahme der Lichtintensität mit zunehmender Schichttiefe. Unter speziellen Nichtgleichgewichtsbedingungen, wie sie z. B. im aktiven Medium eines Lasers realisiert sind, kann n_I auch positiv werden; die Lichtintensität wächst mit zunehmender Schichttiefe an, d. h. das Licht wird im Medium verstärkt.

1.2.6 Streuung

Neben der Absorption ist die Streuung der zweite, wichtige Mechanismus wie Licht im Gewebe abgeschwächt werden kann. Dringt ein kollimierter Lichtstrahl in das Gewebe ein, wird das Licht durch verschiedene *Streuzentren* aus dem einfallenden Strahl herausgestreut und die Intensität des Strahls vermindert. Abhängig von der Größenordnung dieser Streuzentren treten unterschiedliche *Streumechanismen* auf, die verschiedenartige Wellenlängenabhängigkeiten zeigen. Zudem legt die Richtung, in die die Streuung erfolgt, die optischen Eigenschaften des Gewebes fest.

Streuzentren der Haut

Streuung in der Haut kann an Atomen, Molekülen, Proteinen, Membranen oder größeren Strukturen wie z. B. Zellorganellen, der Zelle selbst oder Kollagenfasern, aber auch an Dichte- und Konzentrationsschwankungen erfolgen. Eine Auflistung der wichtigsten Streuzentren in den einzelnen Hautschichten, sowie deren Größenordnung und Volumenanteil sind in Tab. 1.1 gezeigt.

Im Stratum corneum erfolgt Streuung überwiegend an Melanosomen und den Keratinresten der Korneozyten, die durch die epidermale Differenzierung aus den Tonofilamenten des Zytoskeletts der Keratinozyten übrig geblieben sind.¹⁸

In der Epidermis, wo übergeordnete Strukturen wie das Bindegewebe der Dermis fehlen, wird das Licht hauptsächlich an zellulären Bestandteilen oder den Zellen selbst gestreut. Zelluläre Bestandteile sind insbesondere das Endoplasmatische Retikulum, Lysosomen, Mitochondrien, Liposomen, der Golgi-Apparat (\varnothing : 1–3 μm) mit seinen Dictyosomen, Ribosomen (25 nm) und der Zellkern (0,5–5 μm) (Abb. 1.8).

Wie im Stratum corneum wird das Licht auch in der Epidermis an Melanosomen oder dessen Bestandteilen, den Melaninpartikeln gestreut. Alle Zellorganellen wie auch die Zelle selbst sind durch Membranen kompartimentiert. Die Membranen in und an der Zelle sind aus etwa 10 nm dicken Lipid-Doppelschichten aufgebaut und stellen eine der Hauptstreuquellen in der Haut dar [Jac96]. Allgegenwärtig in den Zellen sind die

¹⁸Das Keratin als wesentlicher Bestandteil des Stratum corneum entsteht nicht erst in den toten Zellen dieser Schicht, sondern ist bereits in den Basalzellen in Form der *Tonofilamente* (Keratinfilamente) vorhanden und wird im Laufe der epidermalen Differenzierung lediglich biochemisch verändert. Im elektronenmikroskopischen Bild durchziehen die Tonofilamente gebündelt das Zytoplasma der Keratinozyten, ähnlich einem Netz, weshalb man sie auch als *Zytoskelett* bezeichnet. Chemisch bestehen die Tonofilamente aus eng verwandten Polypeptiden, den *Zytokeratinen* [Jun98].

Hautschicht	Streuzentrum	Größenordnung	Volumenanteil
Stratum corneum	Melanosomen	0,1–1,2 μm [Dan69]	
	Keratinreste	l : μm , \emptyset : 7–10 nm [Jun98]	
Epidermis	Zellen	10 μm	
	Zellorganellen	20 nm – 5 μm	
	Melaninpartikel	20–300 nm [VWW94]	
	Membranen	d : 10 nm	1–20 % (Tab. 9.1 in Ref. [Duc90])
	Proteine	< 10 nm	
Dermis	Kollagenfasern	\emptyset : 0,1–8 μm	$21 \pm 10 \%$ [Jac96] ^a
		\emptyset : 2,8 μm (n=9)	ρ : $3 \times 10^6 \text{ cm}^{-3}$ [SJT95]

l : Länge, d : Dicke, \emptyset : Durchmesser, ρ : Dichte

^a berechnet mit der Formel: Volumenanteil $f_V = \pi \bar{\emptyset}^2 \rho / 4$

Tabelle 1.1: Wichtige Streuzentren der einzelnen Hautschichten, deren Größenordnung und Volumenanteil (Erklärungen siehe Text).

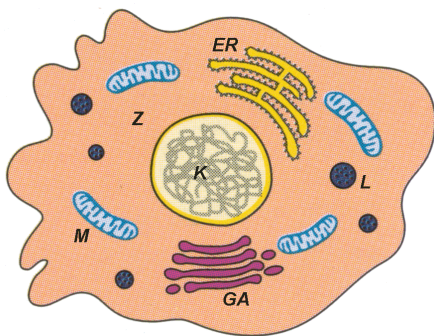


Abbildung 1.8: Schematischer Aufbau einer menschlichen Zelle. **Z** Zytoplasma. **L** Lysosom. **ER** Endoplasmatisches Retikulum. **K** Zellkern. **M** Mitochondrium. **GA** Golgi-Apparat.

Proteine, die Molekülgrößen bis 10 nm erreichen können und mengenmäßig den größten Anteil aller organischen Verbindungen im Zytoplasma der Zelle stellen.

In der Dermis erfolgt die Streuung von Licht an Kollagenfasern, deren Durchmesser von etwa $0,1\ \mu\text{m}$ bei Fibrillen bis zu $8\ \mu\text{m}$ bei Faserbündeln variieren kann. Diese Art der Streuung ist außerordentlich stark und scheint die Eindringtiefe von optischer Strahlung in der Dermis zu beschränken [AP82]. Die Stärke der Streuung ist auch auf den hohen Volumenanteil der Kollagenfasern von etwa 20 % zurückzuführen, der nur mehr von den Lipiden in den Membranen (1–20 %) erreicht wird.

Streumechanismen

Abhängig von Größe, Form und Brechungsindex der Streuzentren erfolgt die Streuung aufgrund verschiedener Streumechanismen. Tab. 1.2 zeigt eine Zusammenstellung möglicher Streumechanismen von Photonen. In allen Fällen erfolgt die Streuung letztlich durch die gebundenen Elektronen der Streukörper. Deshalb hängt die Streuung auch wesentlich von zwei Parametern ab, der Resonanzfrequenz ν_R der streuenden Teilchen und dem Verhältnis von Photonenenergie ν_0 zu Elektronenruheenergie $m_e c^2$.¹⁹

Für das gestreute Licht läßt sich keine einfache Beziehung angeben, da hier der Streuwinkel θ eingeht. Außerdem braucht die Frequenz ν des gestreuten Lichts nicht mit der Frequenz des einfallenden Lichts ν_0 übereinzustimmen. Man unterscheidet daher

- *elastische Streuung*, bei der keine Frequenzänderung stattfindet und
- *unelastische Streuung*, bei der eine Frequenzänderung des Lichts stattfindet.

Bei Frequenzen, die im sichtbaren Teil des Spektrums liegen ($\nu = 385 \dots 770\ \text{THz}$, $\lambda = 780 \dots 390\ \text{nm}$) tritt fast ausschließlich elastische Streuung auf. Für die Streuung von Licht in Gewebe sind deshalb folgende Mechanismen von besonderer Bedeutung:

Rayleigh-Streuung: An Molekülen und sehr kleinen Teilchen mit Dimensionen kleiner als etwa ein 10tel der Wellenlänge des Lichts tritt vorrangig Rayleigh-Streuung auf. Wird das Licht an submikroskopischen Schwebeteilchen in Flüssigkeiten („kolloide Lösungen“) gestreut, spricht man auch von *Tyndall-Streuung*. Diese Art der Streuung

¹⁹Bei hohen Lichtfrequenzen (Röntgenlicht) spielt die Resonanzfrequenz der Elektronen praktisch keine Rolle mehr und diese können als frei angesehen werden.

Bezeichnung	Streukörper	Frequenzbereich	Frequenz- verschiebung $\delta\nu/\nu_0$
Elastische Streuung			
Rayleigh-Streuung	Teilchen, die klein gegen die Wellenlänge sind		0
Resonanz-Streuung	Anregung atomarer Übergänge in Resonanz	$\nu_0 = \nu_R$	0
Mie-Streuung	Teilchen, die groß gegen die Wellenlänge sind		0
Thomson-Streuung	quasifreie Elektronen	$h\nu_R \ll m_e c^2$	$h\nu_0 \ll 0$
Unelastische Streuung			
Compton-Streuung	freie Elektronen	$\nu_0 \gtrsim m_e c^2$	$-(10^{-3} - 10^{-1})$
Paar-Erzeugung	Atomkerne	$h\nu \geq 2m_e c^2$	-1
Raman-Streuung	Molekülschwingungen, optische Gitterschwingungen	$\nu_0 \gg \nu_R$	$\pm(10^{-3} - 10^{-2})$
Brillouin-Streuung	akustische Schwingungen in Kristallen und Flüssigkeiten	$\nu_0 \gg \nu_R$	$\pm(10^{-6} - 10^{-5})$

ν_0 = Frequenz des eingestrahltten Lichts, ν_R = Resonanzfrequenz des Systems
 $m_e c^2$ = Elektronenruheenergie (511 keV)

Tabelle 1.2: Zusammenstellung der Streumechanismen von Photonen [BS87].

ist im allgemeinen schwach, nahezu isotrop,²⁰ polarisiert und ändert sich invers zur 4ten Potenz der Wellenlänge.²¹

Resonanz-Streuung: An Teilchen, deren Größenordnung mit der Wellenlänge des einfallenden Lichts vergleichbar ist, ist die auftretende Streuung wesentlich stärker, mehr vorwärts gerichtet und ändert sich invers mit der Wellenlänge. Diese Art der Streuung wird als Resonanz-Streuung bezeichnet und ist im „Wellenbild“ des Lichts leicht einzusehen (siehe unten).

Mie-Streuung: Sind die streuenden Teilchen groß gegen die Wellenlänge, so ist die auftretende Streuung wieder geringer und stark vorwärts gerichtet, man spricht von Mie-Streuung. Die Wellenlängenabhängigkeit der Mie-Streuung wird beeinflusst durch Größe, Form und Brechungsindex der streuenden Teilchen [SJT95] und liegt in der Größenordnung $\lambda^{-0,4}$ [GAZ92].

Die elastische Streuung ist im „Wellenbild“ leicht zu erklären: Unter dem Einfluss der elektrischen Feldstärke des Lichts beginnen die elastisch gebundenen Elektronen bei Bestrahlung zu oszillieren und wirken als *Hertzsche Dipole*, d. h. jedes oszillierende Elektron strahlt Licht der gleichen Frequenz ab. Diese Abstrahlung erfolgt je nach Anordnung und Abmessung der streuenden Teilchen in einem weiten Winkelbereich. Bei der Mie-Streuung sind die Teilchen groß gegen die Wellenlänge und die von den verschiedenen Punkten des Teilchens abgestrahlten Lichtwellen können interferieren.²² Bei der Rayleigh-Streuung sind die Teilchen klein gegen die Wellenlänge und ihre Struktur hat keinen Einfluss auf die Abstrahlcharakteristik. Jedes Teilchen strahlt mit der für einen Hertzschen Dipol typischen Richtungsabhängigkeit. Die Amplitude der gestreuten Welle hängt jedoch stark vom Bindungszustand des Elektrons ab [BS87].

²⁰in alle Richtungen des Raumes gleich stark

²¹In der von *Lord Rayleigh* entwickelten, sehr ausführlichen Theorie zur Streuung von Licht [Ray71] wird für die darin hergeleitete *Schwächungskonstante* h folgender Wert angegeben:

$$h = \frac{8\pi^3}{3N\lambda^4}(n^2 - 1) \quad (1.15)$$

N die Teilchendichte, λ die Wellenlänge und n der Brechungsindex des durchstrahlten Mediums. Die starke Wellenlängenabhängigkeit der Schwächungskonstante h gibt u. a. auch die Erklärung für die Blaufärbung des Himmels: Da die blau-violetten Wellen ($\lambda = 0,38 \mu\text{m}$) des Sonnenlichts fast nur halb so lang sind wie die roten Wellen ($\lambda = 0,65 \mu\text{m}$), wird das blaue Licht fast $2^4 = 16$ mal stärker gestreut als das rote Licht; der Himmel erscheint blau.

²²Durch die bei der Abstrahlung auftretenden Inferenzen entstehen charakteristische „Abstrahlkeulen“, aus denen auf die Struktur und Abmessungen der Teilchen geschlossen werden kann.

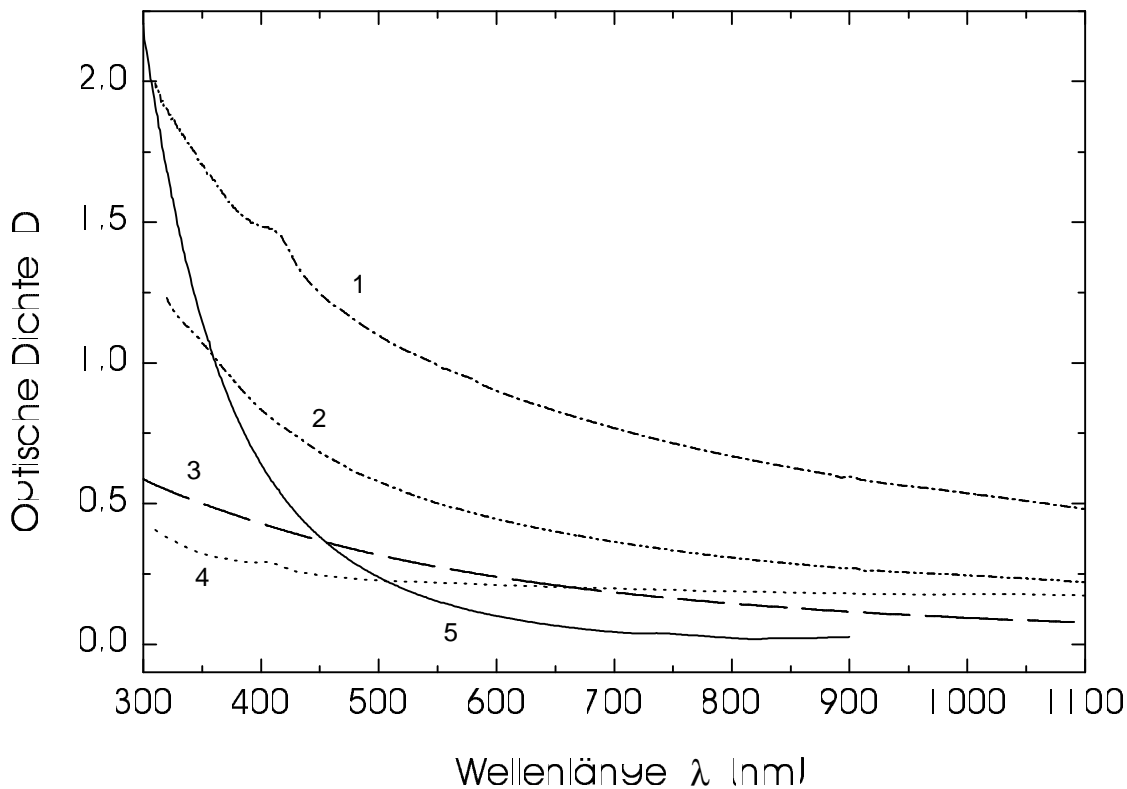


Abbildung 1.9: Beispiele für verschiedene Streumechanismen. Zur Erklärung der gezeigten Kurven siehe Tab. 1.3.

Anhand von Abb. 1.9 wird der Einfluss der unterschiedlichen Streumechanismen deutlich. Die Abbildung zeigt die Extinktion (Optische Dichte D) von verschiedenen Proben in Abhängigkeit von der Wellenlänge λ . Eigenschaften der Proben sowie die ermittelten Wellenlängenabhängigkeiten beim Anpassen an die Funktion $f(\lambda) = a\lambda^{-n}$ sind in Tab. 1.3 aufgelistet.

Bei allen Proben ist eine mehr oder weniger starke Zunahme der Extinktion für kleiner werdende Wellenlängen zu erkennen. Die Zunahme der Extinktion ist dabei fast ausschließlich auf die zunehmende Streuung zurückzuführen. Dies erkennt man am gleichmäßigen, kontinuierlichen Anstieg der Extinktion, im Gegensatz zum Auftreten von Banden (wie bei den Proben 1 und 4 im Bereich 400 nm) bei der Absorption.

Die geringste Wellenlängenabhängigkeit zeigt die Zellsuspension mit einem Exponenten deutlich unter eins. Hier wird das Licht an Zellorganellen und nicht-zerstörten Membranen gestreut. Insgesamt sind die Zellen jedoch sehr ungeordnet verteilt. Eine deutlich größere Wellenlängenabhängigkeit zeigt die Dermis, wo zur Streuung an Zel-

Nr.	Probe	Eigenschaften	n
1	Dermis	Praeputium, Dicke: 0,28 mm	1,13
2	Epidermis	Praeputium, ^a Dicke: 0,13 mm	1,48
3	Latexmilch	Regent-Neutramilch® 1:8000 in Wasser	1,47
4	Zellsuspension	HaCaTs (Keratinocyten-Zelllinie), 2,9 Mio./ml	0,61
5	Kolloid	SiO ₂ -Kristalle in Wasser, Partikelgröße: 22 nm	4,27

Berechnung der Wellenlängenabhängigkeit durch die Funktion $f(\lambda) = a\lambda^{-n}$.

^a Zur Ablösung der Epidermis wurde die Haut mehrere Stunden bei 4 °C in Dispase eingelegt.

Tabelle 1.3: *Eigenschaften und Wellenlängenabhängigkeit der Beispiele aus Abb. 1.9.*

len die übergeordnete Struktur der Kollagenfasern hinzukommt. Aufgrund der Größe dieser Strukturen tritt in erster Linie Resonanz- und Mie-Streuung auf, wodurch der Exponent nahe bei eins liegt. Zudem ist in der Probe 1 eine deutliche Absorptionsbande bei etwa 410 nm zu erkennen, die auf die Anwesenheit von Hämoglobin schließen läßt. Die noch stärkere Wellenlängeabhängigkeit der Epidermis, wo übergeordnete Bindege-
websstrukturen wie in der Dermis fehlen ist auf zelluläre Bestandteile zurückzuführen, die im Gegensatz zur Zellsuspension jetzt aber in geordneter Form vorliegen. Der Ex-
ponent von etwa 1.5 deutet auf einen erhöhten Anteil von Rayleigh-Streuung aufgrund
von Proteinen und kleinerer Zellorganellen hin. Ein ähnliches Streuverhalten wie für
die Epidermis ist für eine Emulsion von Latexmilch in Wasser zu beobachten. Hier
scheinen Partikelgröße und -verteilung in der gleichen Größenordnung zu liegen. Das
Streuverhalten eines nahezu idealen Rayleigh-Streuers zeigt die Probe 5. Die Parti-
kelgröße von 22 nm in dem Kolloid liegt mehr als ein 10tel unter der Wellenlänge des
verwendeten Lichts, wodurch ein Exponent von etwa 4 zustandekommt.²³

Richtungsabhängigkeit der Streuung

Neben der Wellenlänge ist die Intensität des gestreuten Lichts stark von der Rich-
tung abhängig. Die Richtungsabhängigkeit der Streuung kann charakterisiert werden
mithilfe der *Phasenfunktion* und des *Anisotropiefaktors*.

²³Die Genauigkeit bei der Anpassung an die zugrundegelegte Funktion $f(\lambda) = a\lambda^{-n}$ nimmt mit
steigendem Exponenten n stark ab; daher weicht der Exponent für das Kolloid auch vom idealen
Wert 4 ab.

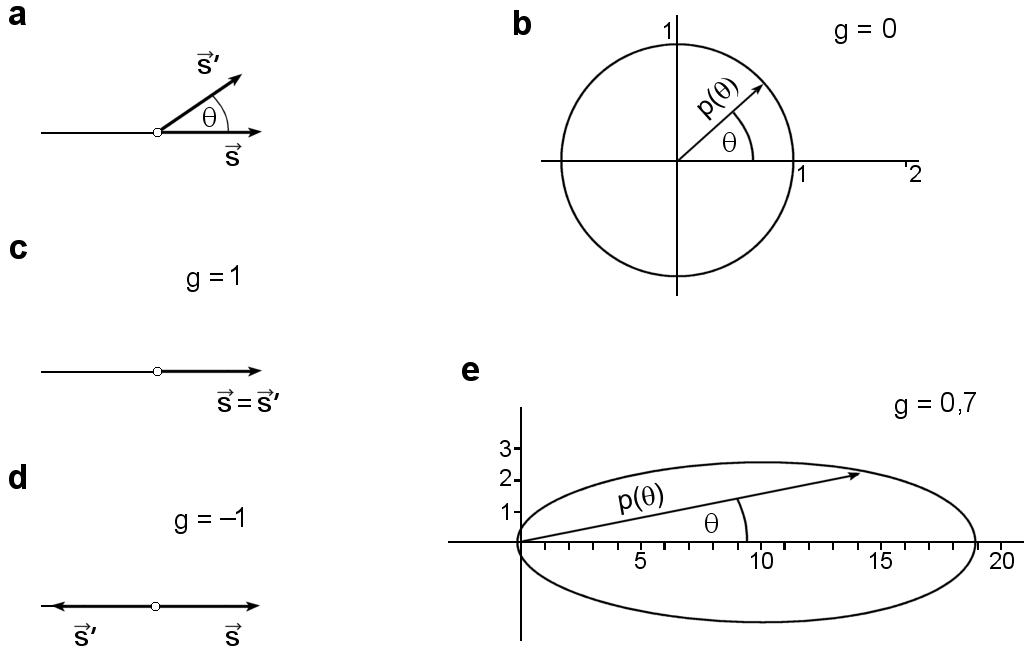


Abbildung 1.10: Beispiele für Phasenfunktionen $p(\theta)$ bei Streuung. **a** Ablenkung eines Photons um den Streuwinkel θ von der ursprünglichen Richtung \vec{s} in eine neue Richtung \vec{s}' ; **b** Isotrope Streuung (Gl. (1.17)); **c** Reine Vorwärts-Streuung (Gl. (1.19)); **d** Reine Rückwärts-Streuung (Gl. (1.20)); **e** Henyey-Greenstein-Phasenfunktion (Gl. (1.21)) für $\mu_s/(\mu_s + \mu_a) = 1$ und $g = 0,7$.

Die Phasenfunktion $p(\vec{s}, \vec{s}')$ gibt die Wahrscheinlichkeit dafür an, dass ein Photon von der Richtung \vec{s} in eine neue Richtung \vec{s}' gestreut wird (Abb. 1.10 a). Unter der Annahme, dass die streuenden Teilchen zufällig im Gewebe verteilt sind und es keine Strukturen im Gewebe gibt, die bestimmte Richtungen begünstigen, hängt die Phasenfunktion nur vom Winkel θ zwischen den beiden Richtungen ab:

$$p(\vec{s}, \vec{s}') = p(\theta) \quad (1.16)$$

Bei isotroper Streuung ist die Wahrscheinlichkeit dafür, dass ein Streuvorgang stattfindet für alle Streuwinkel θ gleich groß. Die Phasenfunktion $p(\vec{s}, \vec{s}')$ ist konstant für alle θ und beschreibt deshalb einen Kreis um das Streuzentrum, das sich im Koordinatenursprung befinden soll (Abb. 1.10 b):

$$p(\theta) = \text{const.} \quad (1.17)$$

Um die Richtungsabhängigkeit der Streuung einfacher angeben zu können, wurde der sog. *Anisotropiefaktor* g eingeführt. Der Anisotropiefaktor gibt die mittlere Richtung der Streuung an und ist damit auch ein Indikator dafür, welche Streumechanismen auftreten. Er ist definiert als

$$g = \int_{-1}^{+1} p(\theta) \cos \theta d(\cos \theta). \quad (1.18)$$

Bei isotroper Streuung gibt es zu jedem Streuvektor \vec{s}' einen entgegengerichteten Vektor und die einzelnen Vektoren löschen sich gegenseitig aus; der Anisotropiefaktor ist Null.

Bei überwiegend vorwärts gerichteter Streuung wird g positiv und im Extremfall von ausschließlicher Vorwärts-Streuung gilt: $g = 1$ (Abb. 1.10 c); dann sind ursprüngliche und neue Richtung des Photons identisch, die Phasenfunktion hat nur für $\theta = 0$ einen von Null verschiedenen Wert:

$$p(\theta) = \begin{cases} \text{const.} & \text{für } \theta = 0 \\ 0 & \text{sonst} \end{cases} \quad (1.19)$$

Bei überwiegend rückwärts gerichteter Streuung nimmt g negative Werte an und im anderen Extremfall, nämlich vollständiger Rückwärts-Streuung würde $g = -1$ gelten (Abb. 1.10 d); Streurichtung und ursprüngliche Richtung des Photons sind entgegengesetzt, die Phasenfunktion hat jetzt für $\theta = \pi$ einen von Null verschiedenen Wert:

$$p(\theta) = \begin{cases} \text{const.} & \text{für } \theta = \pi \text{ (180 }^\circ\text{)} \\ 0 & \text{sonst} \end{cases} \quad (1.20)$$

Für Streuvorgänge in der Haut am ehesten zutreffend ist eine Phasenfunktion, die nach ihren Begründern *L. G. Henyey* und *J. L. Greenstein* benannt ist [HG41, Hul80].²⁴ Die Henyey-Greenstein-Phasenfunktion enthält neben dem Anisotropiefaktor g noch die Koeffizienten μ_a und μ_s , die die Absorption bzw. Streuung im Gewebe beschreiben (siehe Abschnitt 1.3). Die beiden Koeffizienten bilden den Vorfaktor $\mu_s/(\mu_s + \mu_a)$, das sog. *Albedo*, das den Anteil der Streuung an der Gesamtextinktion angibt:

$$p(\theta) = \left(\frac{\mu_s}{\mu_s + \mu_a} \right) \frac{1 - g^2}{(1 + g^2 - 2g \cos \theta)^{3/2}} \quad (1.21)$$

²⁴Ursprünglich entwickelt wurde die *Henyey-Greenstein-Phasenfunktion* zur Beschreibung von diffuser Strahlung im Weltall; erst viel später stellte sich heraus, dass damit auch die diffuse Streuung von Licht in Gewebe sehr gut beschrieben werden kann.

Die Anpassung experimenteller Werte an die Henyey-Greenstein-Phasenfunktion zeigt, dass diese Funktion das Streuverhalten in der Haut sehr gut beschreibt (Abb. 1.11). Errechnete Werte für den Anisotropiefaktor liegen bei $g = 0,7-0,9$, was auf eine starke Vorwärts-Streuung hindeutet (Abb. 1.13). Mit abnehmendem Anisotropiefaktor g nähert sich die „eiförmige“ Phasenfunktion zunehmend einem Kreis um das Streuzentrum an und ist für den Fall von isotroper Streuung ($g = 0$) mit Gl. (1.17) identisch.

1.3 Optische Eigenschaften der Haut

Die optischen Eigenschaften der Haut können durch mikroskopische, gewebespezifische Parameter sowie mithilfe von makroskopischen Messgrößen, die aus dem Zusammenwirken der mikroskopischen Effekte hervorgehen, angegeben werden.

1.3.1 Mikroskopische Parameter

Mikroskopisch können die optischen Eigenschaften der Haut beschrieben durch den *Absorptions-* und *Streukoeffizient* μ_a bzw. μ_s und den *Anisotropiefaktor* g sowie den Brechungsindex n . Streng genommen — im physikalischen Sinn — sind diese Größen Funktionen des Ortes innerhalb des Gewebes, also z. B. $\mu_a = \mu_a(\vec{r})$, werden jedoch in Ermangelung geeigneter Messmethoden und hinreichend hoher Messgenauigkeit in der Regel als Mittelungen über die gesamte Probe oder Volumenelemente innerhalb der Probe angegeben.

μ_a und μ_s sind gemäß dem Lambert-Beerschen Gesetz (1.10) als Dämpfungskonstanten der exponentiellen Abnahme der Lichtintensität mit wachsender Schichtdicke definiert und entsprechen physikalisch der mittleren Anzahl an Absorptions- bzw. Streueignissen pro Längeneinheit auf dem Weg der Photonen durch das Medium. Der Anisotropiefaktor g steht für den mittleren Cosinus der auftretenden Streuwinkel.

Darüber hinaus kann die Gesamtschwächung von Licht in Gewebe beschrieben werden durch den *totalen Schwächungskoeffizient* $\mu_t = \mu_a + \mu_s$, der die Extinktion infolge von Absorption und Streuung zusammenfasst.²⁵ Der *reduzierte* (oder Transport-) Streukoeffizient $\mu_s' = (1 - g) \mu_s$ gibt die effektive Streuung im Gewebe an.²⁶

²⁵Während in der Physik die Abschwächung von Licht meist in Form des *Extinktionskoeffizient* $\alpha = \kappa + s$ angegeben wird (κ ist der Absorptionskoeffizient, s der Streukoeffizient), spricht man in Zusammenhang mit der Haut meist vom *Schwächungskoeffizient* $\mu_t = \mu_a + \mu_s$.

²⁶Wie man leicht herleitet, gilt für vollständige Vorwärts-Streuung ($g = 1$) $\mu_s' = 0$, da in diesem

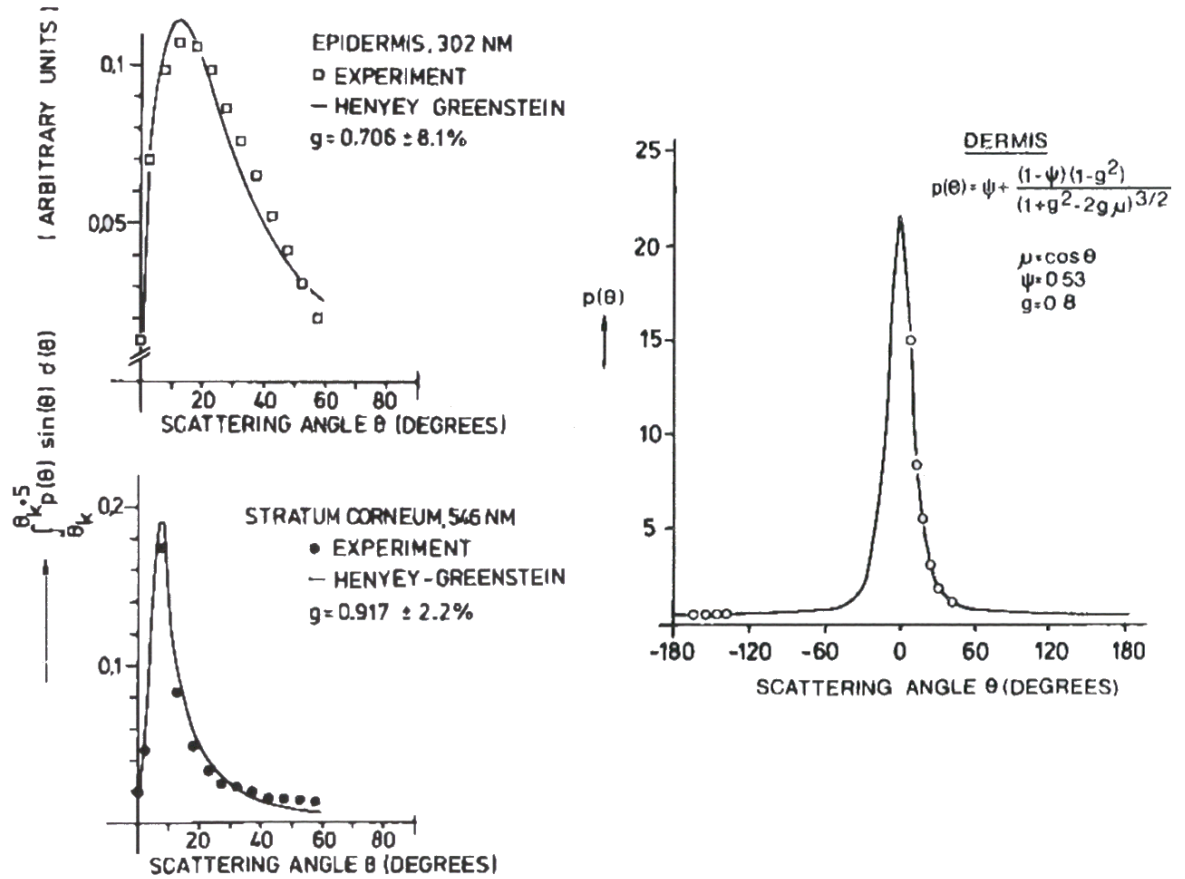


Abbildung 1.11: Anpassung der Henyey-Greenstein-Phasenfunktion (Gl. (1.21)) an goniometrische Messungen [GJS89]. **Links** Messungen von Bruls (Fig. 7 und Tab. I) [BL84] an Epidermis und Stratum corneum bzgl. $\int_{\theta_k}^{\theta_k+5^\circ} p(\theta) \sin \theta d\theta$, wobei θ_k folgendermaßen variiert: $\theta_1 = 0, \theta_2 = 5^\circ, \theta_3 = 10^\circ$, etc. **Rechts** Messungen von Jacques et al. [JAP87] und Prahl (Prahl SA. Three-dimensional calculations of light distribution in tissue. The University of Texas at Austin, 1986. unpublished) an Dermis.

Hierzu gibt es zahlreiche Angaben in der Literatur, die auszugsweise in den Abbildungen 1.12 und 1.13 sowie den Tabellen 1.5–1.7 am Ende dieses Kapitels dargestellt sind. Die z. T. beachtlichen Differenzen in den Werten kommen meist durch unterschiedliche Messverfahren [WPF87, CPW90] und Präparationen sowie interindividuelle Unterschiede von Hautproben und Inhomogenitäten in der Haut zustande.

1.3.2 Makroskopische Messgrößen

Als makroskopische Messgrößen werden *Reflexion*, *Remission* und *Transmission* bezeichnet. Die Definition dieser Größen bei Messungen an Hautproben zeigt Abb. 1.14.

Sowohl die Remission wie auch die Transmission zeigen bei Anwesenheit von Hämoglobin deutliche Absorptionsbanden um 418 nm und 540–580 nm (Abb. 1.15). Oberhalb 600 nm wird für die Remission meist eine leichte Abnahme, für die Transmission eine Zunahme mit steigender Wellenlänge berichtet [JP87, PWP90]. Die Summe aus gesamter Transmission T_t und gesamter Remission R_t sollte dabei eins ergeben, sofern R_t auch die Reflexion enthält und das transmittierte bzw. remittierte Licht hinreichend gut gesammelt wurde, da die Absorption bei diesen Wellenlängen zu vernachlässigen ist. Unterhalb von 320 nm ist die Absorption sehr viel stärker, da hier die Absorptionsbanden zahlreicher endogener Chromophore liegen (siehe Abschnitt 2.1), sodass nur mehr sehr wenig Licht remittiert bzw. transmittiert wird.

Die Abhängigkeit der makroskopischen Messgrößen Transmission und Remission von den mikroskopischen Parametern μ_a und μ_s' zeigt Abb. 1.16. Für kleine Streukoeffizienten μ_s' sind die beiden Größen nahezu unabhängig vom Absorptionskoeffizient μ_a . Erst bei größerer Streuung macht sich die Abnahme der Remission und Transmission mit steigender Absorption bemerkbar; durch die vermehrte Streuung verlängert sich der Weg der Photonen im Gewebe, wodurch die Wahrscheinlichkeit zur Absorption der Photonen steigt.

Reflexion

Für senkrechten Einfall ergibt sich für die (Fresnelsche) Reflexion von Licht an der Hautoberfläche aufgrund des Brechungsindexunterschieds zwischen Luft ($n = 1$) und Haut ($n \approx 1.5$) rechnerisch ein Wert von 4 %. *In vivo* gemessene Werte liegen sowohl für weiße wie auch für schwarze Haut im gesamten Spektrum von 250–3000 nm zwischen 4 % und 7 % [PAU78, AHP80].

Fall die Streuung unbemerkt bleibt; für isotrope Streuung ($g = 0$) gilt $\mu_s' = \mu_s$ und bei vollständiger Rückwärts-Streuung ($g = -1$) sogar $\mu_s' = 2\mu_s$.

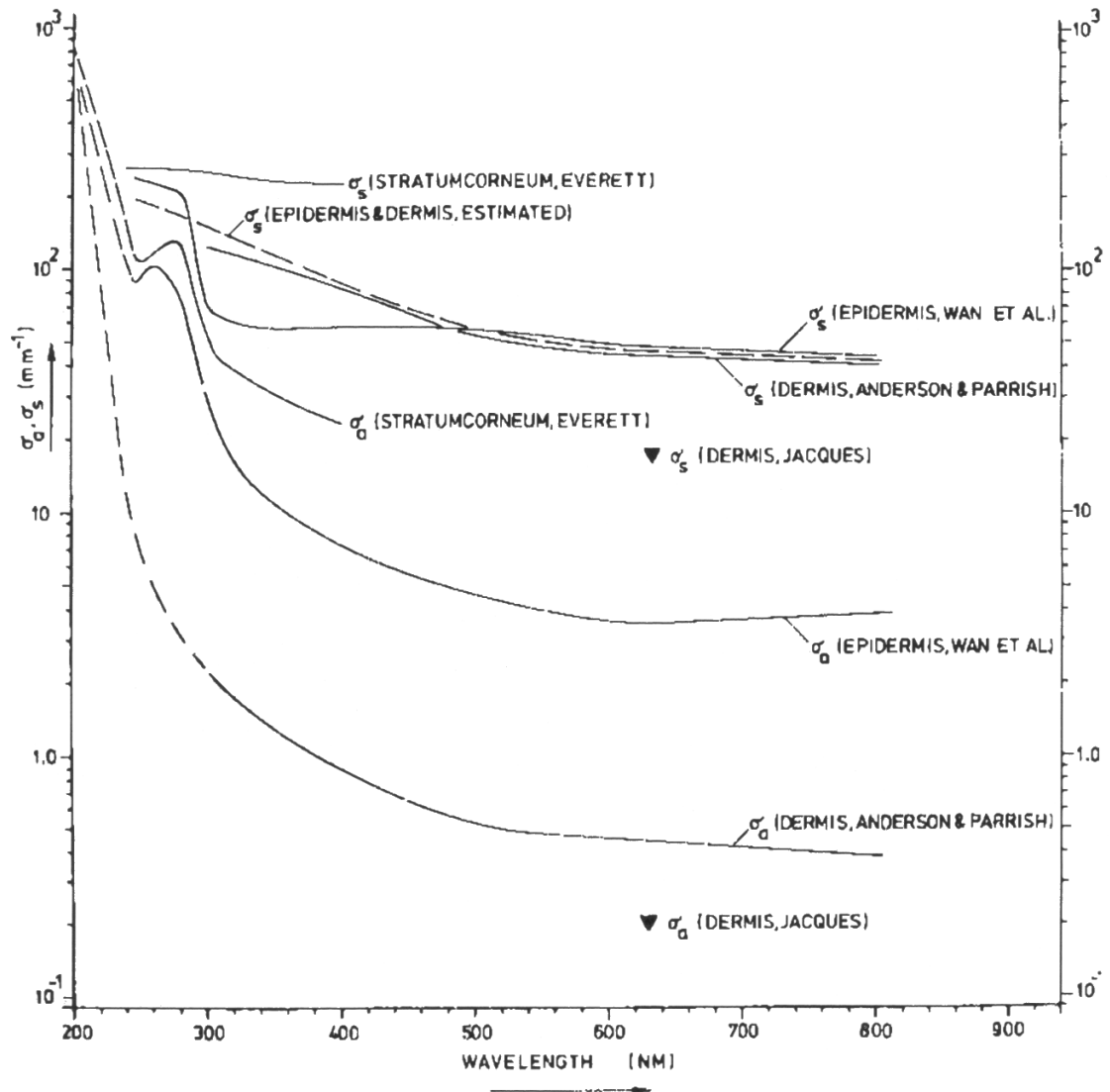


Abbildung 1.12: Zusammenstellung experimenteller Werte für Absorptions- (σ_a) und Streukoeffizienten (σ_s) [GJS89]. Stratum corneum (Daten von Everett et al. [EYS66]); Epidermis (Daten von Wan et al. [WAP81]); Dermis (Daten von Anderson u. Parrish [AP82] und Jacques et al. [JAP87]). Für sehr kurzwelliges UV-Licht ($\lambda < 200 \text{ nm}$) erreicht der Absorptionskoeffizient wahrscheinlich Werte von $\sigma_a \approx 1000 \text{ mm}^{-1}$ (gestrichelter Abschnitt). Der geschätzte Streukoeffizient von Epidermis und Dermis zusammen $\sigma_s(\text{EPIDERMIS \& DERMIS, ESTIMATED})$ ist ebenfalls gestrichelt eingezeichnet und geht auf [GJS89] zurück.

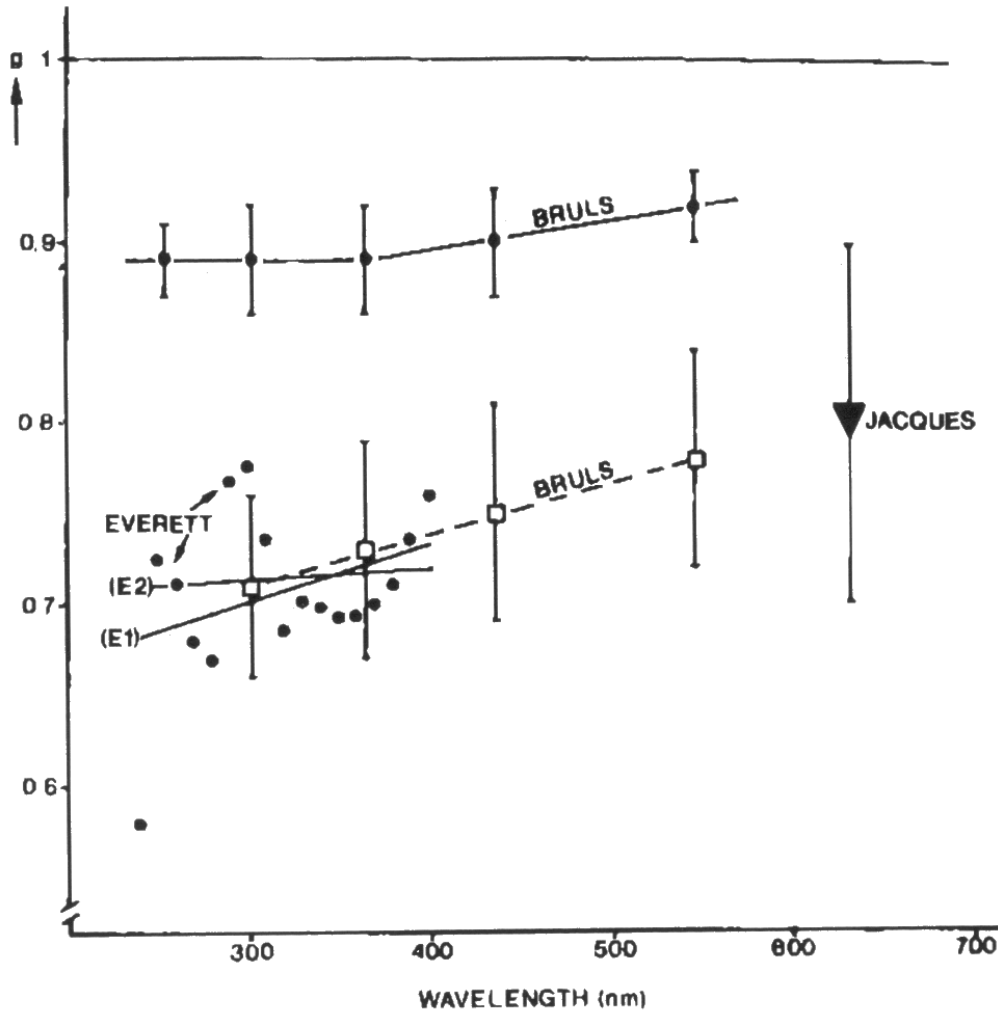


Abbildung 1.13: Zusammenstellung experimenteller Werte für den Anisotropiefaktor g [GJS89]. Stratum corneum (●) aus experimentellen Daten von Bruls [BL84] und Everett et al. [EYS66]; Epidermis (□) aus Daten von Bruls [BL84]; Dermis (▼) von Jacques et al. [JAP87]. Die analysierten Daten von Everett et al. zeigen erhebliche Abweichungen. Eine lineare Regression der Daten gemäß $g = A + B\lambda$ (Wellenlänge λ in nm) ergab: $A = 0,603$; $B = 3,23 \times 10^{-4}$, siehe Gerade (E1); vernachlässigt man, wie Diffey [Dif83] den Punkt bei 240 nm, erhält man: $A = 0,692$; $B = 6,7 \times 10^{-5}$, siehe Gerade (E2), oder einen nahezu wellenlängeunabhängigen Wert für g von 0,715 (250–400 nm), in guter Übereinstimmung mit $g = 0,68$, hergeleitet aus Diffey's $\beta = 0,84$.

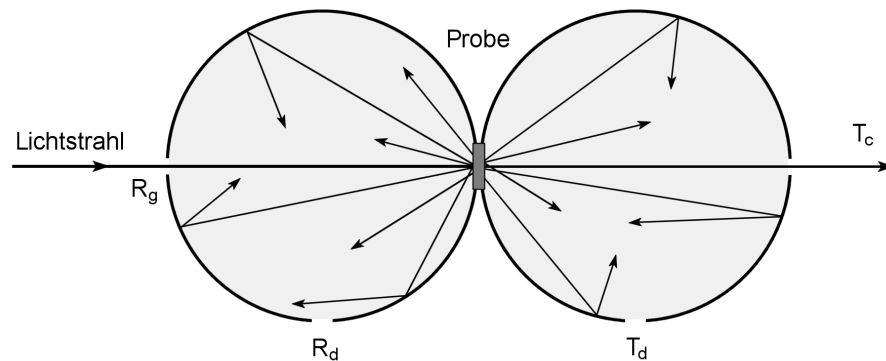


Abbildung 1.14: Definition von Reflexion, Remission und Transmission bei Messungen an Hautproben mit der Ulbrichtkugel (integrating sphere). Die Messung von gerichteter Reflexion (R_g), diffuser Reflexion/Remission (R_d) und totaler Reflexion/Remission ($R_t = R_g + R_d$) erfolgt bei Anordnung der Probe am Ausgang der Ulbrichtkugel (linker Teil). Die Messung von kollimierter Transmission (T_c), diffuser Transmission (T_d) und totaler Transmission ($T_t = T_c + T_d$) erfolgt bei Anordnung der Probe am Eingang der Ulbrichtkugel (rechter Teil).

Remission

Da absorbiertes Licht nicht mehr remittiert werden kann, ist die Remission, wie auch die Transmission, ganz entscheidend von der Pigmentierung der Haut abhängig. Daraus hat sich mit der (diffusen) *Reflexions-/Remissions-Spektroskopie* eine wichtige Anwendung ergeben, mit der die Konzentration einzelner Chromophore der Haut (v. a. Melanin) abgeschätzt werden kann [FDB81].

Weil die Stärke der Remission aber auch von der Haut- bzw. Probendicke abhängt [HHM56], treten bei Messungen starke Abweichungen auf und können nur bedingt miteinander verglichen werden. Die gemessenen Werte liegen je nach Probendicke und Wellenlänge zwischen 10 % und 40 % (Tab. 1.8). Im nahen IR ist die Remission sehr viel kleiner und zeigt deutliche Minima bei den Absorptionsbanden des Wassers [HHM56].

Transmission

Wie die Remission ist auch die Transmission unterhalb etwa 320 nm geprägt durch die starke Absorption der Haut in diesem Bereich [EYS66]. Im sichtbaren Bereich des Spektrums wird bereits durch das in der Epidermis liegende Melanin ein Großteil des ankommenden Lichts absorbiert oder reflektiert, sodass je nach Lokalisation nur mehr

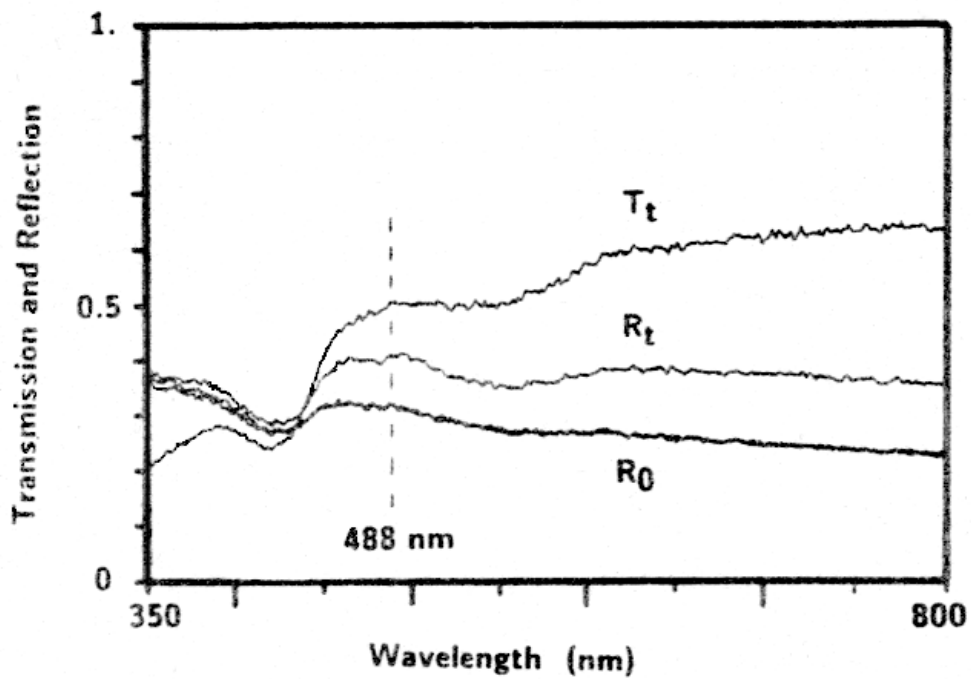


Abbildung 1.15: Spektrale Verteilung von totaler Transmission T_t , totaler Remission (mit Reflexion) R_t und totaler Remission mit schwarzem Hintergrund R_0 . Eingezeichnet sind zwei Spektren für R_0 (schwarz lackiertes Glas als Hintergrund und schwarze India-Farbe enthaltendes Agar-Gel), die praktisch nicht zu unterscheiden sind [JP87].

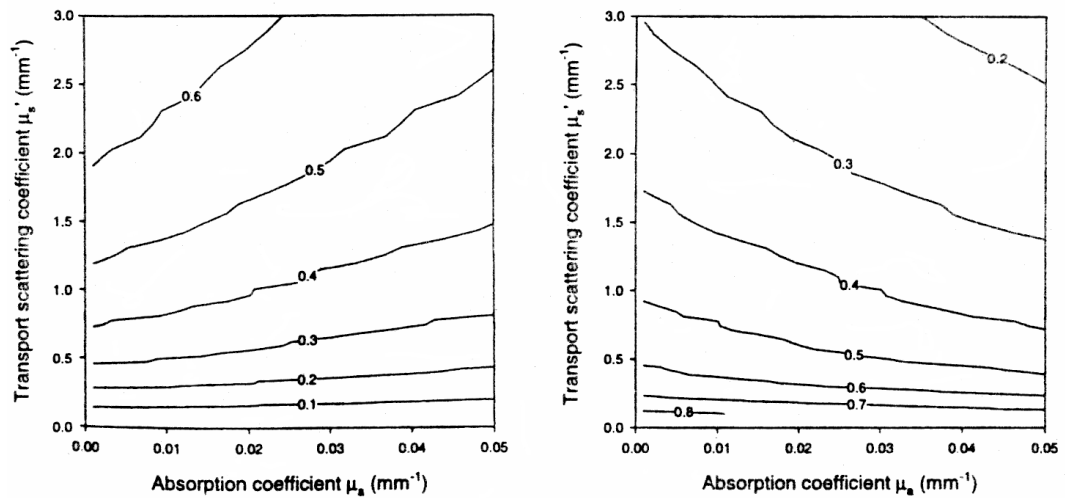


Abbildung 1.16: Remission (links) und Transmission (rechts) von Licht in Haut als Funktion von Absorptions- und Streukoeffizient (Monte-Carlo-Simulation) [SKE98]. Annahmen des Modells sind fiktive Hautproben (Dicke: 2 mm, \varnothing : 16 mm), die von einem Gauss-verteilten Lichtstrahl (\varnothing : 5 mm) unter einem Einfallswinkel von 8° getroffen werden. Für 4000 Kombinationen von Absorptions- und Streukoeffizienten ($\mu_a = 0,001\text{--}0,1\text{ mm}^{-1}$, $\mu_s = 1\text{--}75\text{ mm}^{-1}$) wurden für eine Henyey-Greenstein-Phasenfunktion mit festem Anisotropiefaktor $g = 0,9$ und Brechungsindex $n = 1,4$ Werte für die zu erwartende Remission und Transmission errechnet; Zwischenwerte wurden interpoliert.

45–80 % die Dermis erreichen. In 2 mm Hauttiefe dringen insgesamt noch etwa 10 %, in 4 mm Tiefe noch etwa 5 % der ursprünglichen Intensität vor [KDW99].

Für die gezielte Bestrahlung der Haut mit Licht und beim Austritt von Fluoreszenzlicht aus der Haut ist die kollimierte Transmission T_c die entscheidende Größe. Deshalb wurde diese Größe in eigenen Messungen für unterschiedliche Probendicken und Lokalisationen bestimmt.

a) Hautpräparation

Zur Verfügung standen 45 Hautproben von 42 Patienten im Alter von 15–84 Jahren (Durchschnitt 51 ± 17 Jahre), die sich einer Hautoperation unterziehen mussten. Unmittelbar nach Entnahme des Gewebes wurden die Proben in luftdichten, feuchtgehaltenen Plastikbehältern verschlossen, um weiteren Wasserverlust zu vermeiden. Nachdem vorhandenes Fettgewebe entfernt worden war, wurden die Proben mit Skalpell und Schere zunehmend abpräpariert, sodass insgesamt 123 Proben mit Hautdicken von 0,1–1,35 mm sowie 2,3 mm und 3,8 mm entstanden. Die Dicke der Haut wurde dabei mithilfe einer Schieblehre und zweier Glasplatten bestimmt. Die Hautproben waren allesamt Hauttyp II oder III (siehe Anhang A) und enthielten kein Blut mehr.

b) Versuchsaufbau

Nach Präparation wurden die Proben auf einer Quarzglasplatte plaziert und mit dem in Abb. 1.17 gezeigten Aufbau gemessen. Das Licht einer Halogen-Projektorlampe (Osram HLX64415, 10 W, 12 V) wurde mittels einer Linse auf den Eingang eines Lichtwellenleiters (Quarzglas, \varnothing 5 mm) fokussiert, an dessen Ausgang es unter dem halben Öffnungswinkel $\alpha = \arcsin NA = 5,7^\circ$ ($NA = 0,1$ numerische Apertur des Lichtwellenleiters) wieder austrat. Das divergente Strahlenbündel wurde dann mit einer weiteren, sehr stark brechenden Linse mit einem Strahldurchmesser von 7 mm auf die Hautprobe abgebildet. Dasjenige Licht, das durch die Probe und die dahinterliegende Glasplatte nicht reflektiert, absorbiert oder gestreut wurde, gelangte über einen zweiten Lichtwellenleiter (Quarzglas, \varnothing 200 μ m, Detektionswinkel 11°) in das Spektrometer (TRIAX-180 PDA, Instruments S.A., München) und wurde von einem Diodenarray mit angeschlossenem PC im Bereich 450–1030 nm aufgezeichnet.

Um die Transmission durch die Probe zu erhalten, wurde neben dem Spektrum der Hautprobe $P(\lambda)$ mit demselben Aufbau auch das Spektrum der Lichtquelle $H(\lambda)$ ohne Hautprobe, aber mit Glasplatte im Strahlengang gemessen. Die Transmission T bei

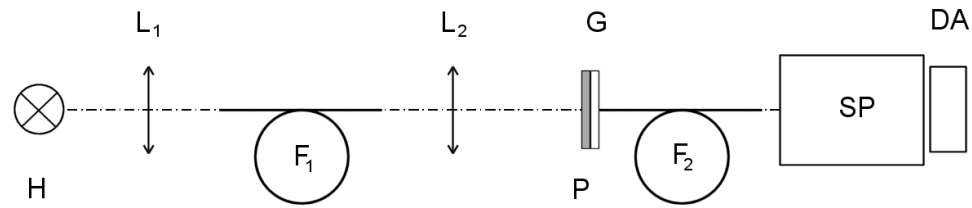


Abbildung 1.17: Versuchsaufbau zur Messung der kollimierten Transmission. **H** Halogen-Projektorlampe. **L₁**, **L₂** Linsen. **F₁**, **F₂** Lichtwellenleiter. **P** Hautprobe. **G** Glasplatte. **SP** Spektrometer. **DA** Diodenarray.

den einzelnen Wellenlängen ergibt sich dann gemäß $T(\lambda) = P(\lambda)/H(\lambda)$. Korrekturen bezüglich der Reflexion an den Grenzflächen Luft | Gewebe | Glas und Luft | Glas waren nicht notwendig (siehe Anhang B).

c) Ergebnisse

Wellenlängenabhängigkeit

Die mittlere Hautdicke der Proben betrug $0,57 \pm 0,42$ mm; das zugehörige Spektrum $T_c(\lambda)$ zeigt Abb. 1.18 (oben). Die Transmission stieg im Bereich 450–1030 nm linear mit der Wellenlänge an ($p < 0,0001$). Durch die große Variation in der Probendicke und starke, interindividuelle Unterschiede war die Standardabweichung vom Mittelwert sehr groß (eingezeichnet bei 500 nm und 1000 nm). Im Bereich um 940 nm war bei allen Spektren eine Absorptionsbande zu beobachten, sodass diese auch durch die Mittelung nicht verschwand. Die Ursache für diese Bande ist bisher nicht geklärt.

Ebenfalls in Abb. 1.18 (oben) eingezeichnet ist das Spektrum einer einzelnen, blutdurchsetzten Hautprobe (Dicke 0,2 mm). Das Spektrum zeigt die für Oxyhämoglobin charakteristischen Absorptionsbanden bei 538 nm und 577 nm.

Die Unterteilung der gemessenen Spektren in verschiedene Hautdickenbereiche ergab die in Abb. 1.18 (unten) gezeigten Verläufe. Auch hier stieg die Transmission für alle Gruppen linear mit der Wellenlänge an. Für $\lambda = 577$ nm betrugen die mittlere Transmission: 0,0497 (0,1–0,2 mm), 0,0249 (0,2–0,3 mm), ..., 0,0015 (2,3–3,8 mm). Trotz der Unterteilung der Proben in Gruppen vergleichbarer Hautdicke waren die Standardabweichungen vom Mittelwert immer noch sehr groß (eingezeichnet bei 500 nm und 1000 nm für die Gruppe 0,1–0,2 mm). Daran erkennt man, wie sehr die Transmission durch die Haut selbst bei gleicher Hautdicke zwischen einzelnen Individuen variieren kann.

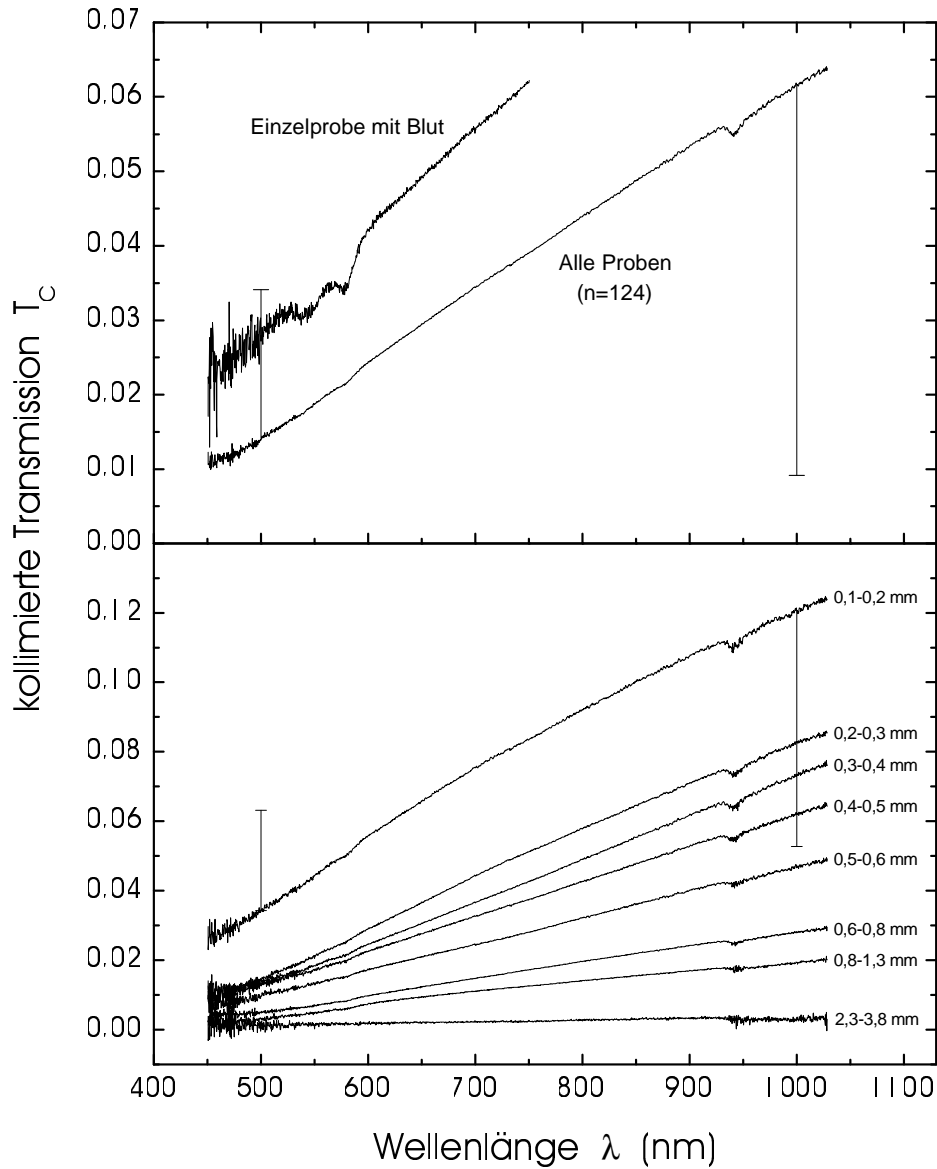


Abbildung 1.18: Kollimierte Transmission T_c in Abhängigkeit von der Wellenlänge. **Oben** Mittlere Transmission aller Proben (Hautdicke $0,57 \pm 0,42$ mm) mit Standardabweichung bei 500 nm und 1000 nm; Transmission einer Einzelprobe mit Blut (Hautdicke 0,2 mm). **Unten** Mittlere Transmission für verschiedene Hautdicken: $0,1 \text{ mm} \leq d < 0,2 \text{ mm}$, $0,2 \text{ mm} \leq d < 0,3 \text{ mm}$, usw. mit Standardabweichung bei 500 nm und 1000 nm für die Gruppe 0,1–0,2 mm.

Dämpfungskonstanten

Nach Umformen des Lambert-Beerschen Gesetztes (Gl. (1.10)) in $\ln(1/T_c) = \alpha d$ mit $T_c = I(d)/I(d=0)$ sieht man, dass die grafische Auftragung von $\ln(1/T_c)$ gegen die Probendicke d die Ermittlung des Extinktionskoeffizienten α (Steigung der Geraden) erlaubt. Da mit zunehmender Hautdicke die Mehrfachstreuung von Photonen immer wahrscheinlicher wird (mittlere freie Weglänge $< 100 \mu\text{m}$), kann man bei dickeren Proben nicht mehr von einer einfach-exponentiellen Schwächung der Intensität durch Absorption und Streuung ausgehen.

Abb. 1.19 (oben) zeigt die oben erwähnte Auftragung für die gemessenen Transmissionen bei $\lambda = 577 \text{ nm}$. Für die Ermittlung des Schwächungskoeffizienten $\mu_t = \mu_a + \mu_s$ wurden wegen der Mehrfachstreuung nur die dünnsten Proben verwendet. Da für $d = 0$ gelten muss: Transmission $T_c = 1$ und damit $\ln(1/T_c) = 0$, erhält man durch Anpassung einer Ursprungsgeraden an die Messwerte (Gerade **A**, Abb. 1.19) aus der Steigung der Geraden einen Wert für μ_t .

Die so ermittelten Werte für Hautdicken $d \leq 0,15 \text{ mm}$ (1) und $d \leq 0,20 \text{ mm}$ (2) zeigt Abb. 1.19 (unten). Wegen der auftretenden Mehrfachstreuung erhält man bei Betrachtung der im Durchschnitt dickeren Proben (2) etwa 30 % niedrigere Werte für μ_t als für die dünneren Proben (1). Für beide betrachteten Schwächungskoeffizienten $\mu_t(\lambda)$ gilt aber, dass der Wert bei 450 nm etwa doppelt so groß ist als bei 1030 nm und dazwischen stetig abnimmt.

Auch für Hautdicken $d > 0,20 \text{ mm}$ konnte die Abnahme der gemessenen Transmissionen in erster Näherung durch ein Exponentialgesetz beschrieben werden (Gerade **B**, Abb. 1.19). Jedoch entspricht die aus der Steigung der Geraden ermittelte Dämpfungskonstante nicht mehr dem Schwächungskoeffizienten des Lambert-Beerschen Gesetzes.²⁷

Die für Hautdicken $d \geq 0,30 \text{ mm}$ (3) und $d \geq 0,50 \text{ mm}$ (4) ermittelten Dämpfungskonstanten sind ebenfalls in Abb. 1.19 (unten) gezeigt. Dabei erzielten die beiden Graphen (3) und (4) bis etwa 600 nm vergleichbare Werte; im weiteren Verlauf erreichten die im Durchschnitt dickeren Proben (4) etwa 90 % (600 nm) bis 80 % (1030 nm) der Werte als

²⁷Laut Definition ist die Anwendung des Lambert-Beerschen Gesetzes nur zulässig, wenn die Abnahme der Intensität eines Lichtstrahls beim Durchstrahlen einer Probe exponentiell mit wachsender Probendicke erfolgt. Dies ist erfüllt, wenn es sich bei den Proben um Lösungen und nicht-streuende Medien handelt, nicht jedoch bei streuenden Medien wie der Haut. Dann wird das Licht in komplizierter Weise (Abschnitt 1.2.6) mit zunehmender Hautdicke geschwächt, da in verstärktem Maße Mehrfachstreuung auftritt und der durch die Streuung bedingte weitere Weg der Photonen durch die Proben die Wahrscheinlichkeit für Absorptionsvorgänge erhöht.

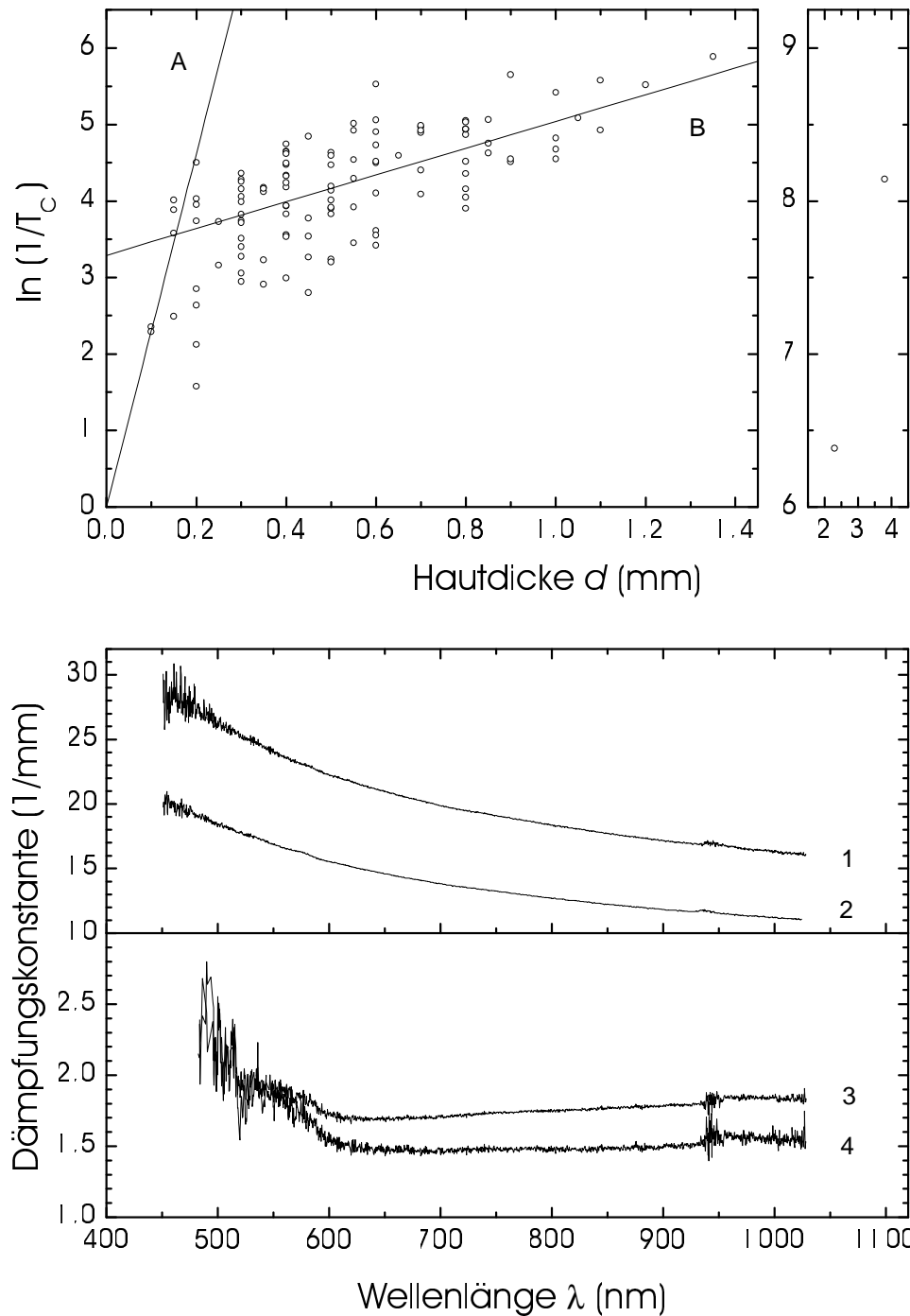


Abbildung 1.19: Ermittlung der Dämpfungskonstanten. **Oben** Ermittlung des Schwächungskoeffizienten μ_t bei $\lambda = 577 \text{ nm}$ aus der Steigung einer Ursprungsgeraden (A) durch die Messwerte der dünnen Proben; Ermittlung der Dämpfungskonstante aus den Messwerten der dickeren Proben (B). **Unten** Schwächungskoeffizienten $\mu_t(\lambda)$ für Proben mit Hautdicke $d \leq 0,15 \text{ mm}$ (1) bzw. $d \leq 0,20 \text{ mm}$ (2) und Dämpfungskonstante für Proben mit $d \geq 0,30 \text{ mm}$ (3) und $d \geq 0,50 \text{ mm}$ (4).

die dünneren Proben (3). Verglichen mit den beiden Schwächungskoeffizienten (1) und (2) sind die Dämpfungskonstanten, die durch Anpassung von Nicht-Ursprungsgeraden an die Transmissionswerte ermittelt wurden, etwa um den Faktor 10 niedriger.

Lokalisationsabhängigkeit

Wegen der aufgetretenen Signalschwankungen wurde zur Bestimmung der Lokalisationsabhängigkeit nicht die kollimierte Transmission einzelner Wellenlängen $T_c(\lambda, d)$, sondern die integrative Transmission $\int_{\lambda_a}^{\lambda_e} T_c(\lambda, d) d\lambda$ über das Detektionsintervall [$\lambda_a = 450$ nm, $\lambda_e = 1030$ nm] verwendet. Dadurch ging zwar die Wellenlängenabhängigkeit des Messsignals verloren, die integrative Transmission unterlag aber nicht mehr den Artefakten, die sich aufgrund des Detektorrauschens bei sehr kleinen Messwerten ergaben.

Abb. 1.20 zeigt die Auftragung von $\ln(\int T_c(\lambda, d) d\lambda)$ gegen die Hautdicke d für die untersuchten Lokalisationen ($n=11$); Tab. 1.4 enthält die Anzahl der Hautproben, die an der jeweiligen Lokalisation verfügbar waren sowie die (negative) Steigung, die sich nach Anpassen einer Ausgleichsgeraden an die Messwerte ergab (eingezeichnet für die Lokalisation „Rücken“). Um bei der Anpassung die Zahl der Freiheitsgrade (Steigung, Achsenabschnitt) in dem unterbestimmten System zu reduzieren, wurde der Achsenabschnitt festgehalten (*constrained fit*). An der Stelle $d = 0$ gilt nämlich:

$$\ln \int_{\lambda_a}^{\lambda_e} T_c(\lambda, d) d\lambda \bigg|_{d=0}^{T_c(\lambda)=1} \ln \int_{\lambda_a}^{\lambda_e} d\lambda = \ln(\lambda_e - \lambda_a) \approx 6,36 \quad (1.22)$$

Die Reduzierung der Freiheitsgrade bei einem Fit führt i. A. zwar zu einer „schlechteren“ Anpassung der Ausgleichsgeraden an die experimentellen Werte (s. Abb. 1.20), jedoch sind die ermittelten Parameter in der Regel aussagekräftiger.

Die aus der Geradensteigung ermittelten Dämpfungskonstanten können in 3 Gruppen unterteilt werden: Schulter, Achsel, Praeputium, Rücken (4,7–5,4); Kopf, Oberarm, Unterarm, Leiste, Unterschenkel (6,0–6,8); Bauch, Oberschenkel (7,6–7,9). Hierbei muss angemerkt werden, dass die Lokalisation „Bauch“ mit 2,1 eine, im Vergleich zu den anderen Lokalisationen ungewöhnlich hohe Standardabweichung aus dem Fit aufweist. Dies liegt daran, dass nur vier Messpunkte zur Verfügung standen, die zudem sehr nahe beieinander lagen und einen kleinen Wertebereich bzgl. der Probendicke (0,15–0,6 mm) abdeckten.

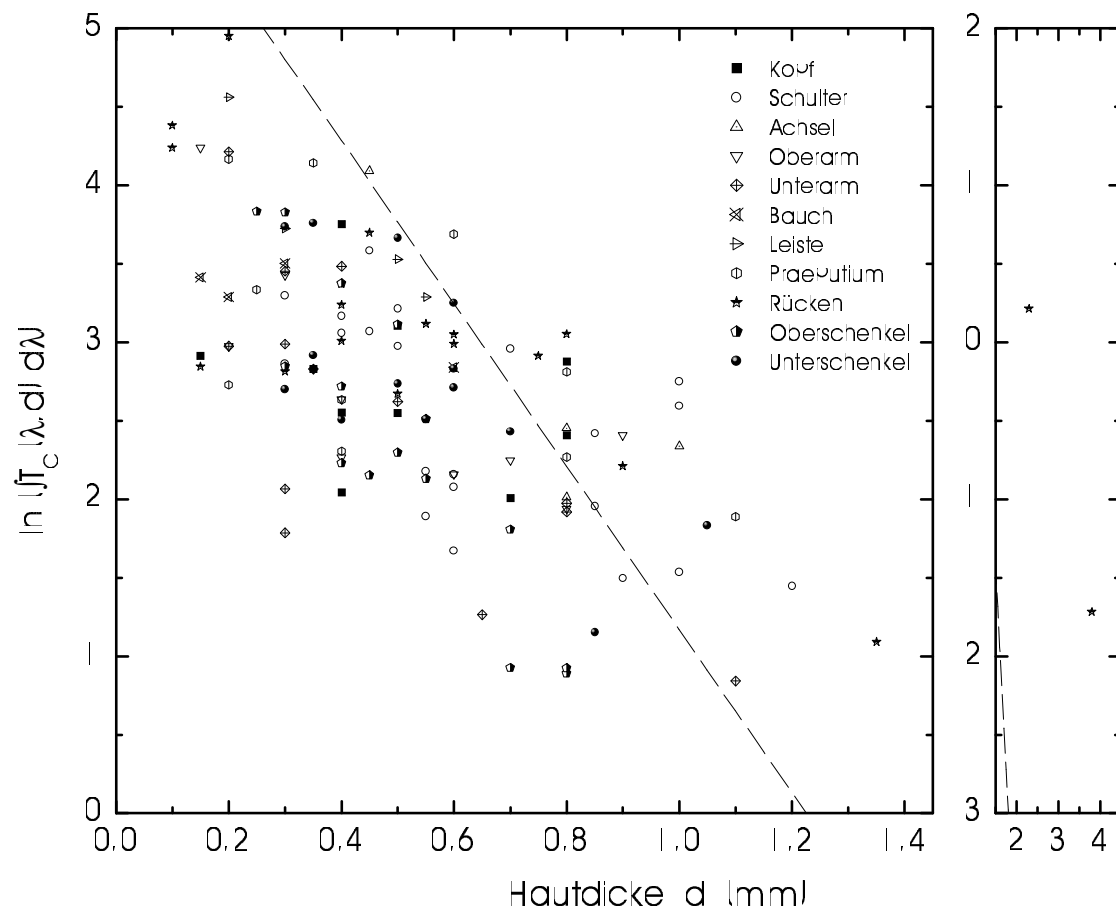


Abbildung 1.20: Ermittlung von lokalisationsabhängigen Unterschieden in der Transmission (Erläuterungen siehe Text).

Lokalisation	Anzahl	(neg.) Steigung
Kopf	10	$6,41 \pm 0,81$
Schulter	21	$5,37 \pm 0,36$
Achsel	4	$4,69 \pm 0,34$
Oberarm	9	$6,31 \pm 0,81$
Unterarm	13	$6,78 \pm 0,76$
Bauch	4	$7,85 \pm 2,14$
Leiste	4	$6,23 \pm 0,73$
Praeputium	10	$5,37 \pm 0,80$
Rücken	19	$5,19 \pm 0,52$
Oberschenkel	15	$7,56 \pm 0,32$
Unterschenkel	14	$6,04 \pm 0,45$

Tabelle 1.4: Anzahl der Messpunkte und negative Steigung der Ausgleichsgeraden aus Abb. 1.20 für verschiedene Lokalisationen.

Abhängigkeit vom Alter

Die Verteilung der Transmissionen war nicht vom Alter der Patienten abhängig. Der Korrelationskoeffizient nach Pearson lag bei 0,018; die Auftragung der integrativen Transmission gegen das Alter a ergab einen leichten Anstieg mit zunehmendem Alter ($\int T_c(\lambda) d\lambda = 20,4 + 0,025 a$).

1.3.3 Zusammenfassende Bemerkungen

Die optischen Eigenschaften der Haut werden im Wesentlichen durch die starke Streuung in der Dermis bestimmt [JK91]. Die Epidermis ist zwar ebenfalls stark streuend, jedoch zu dünn, um großen Einfluss auszuüben. Das Verhältnis aus diffuser zu kollimierter Transmission durch das Stratum corneum und die Epidermis scheint weder im UV- noch im sichtbaren Bereich von der Wellenlänge abzuhängen [EYS66, Luc30]. Dies bedeutet, dass die diffuse Natur der epidermalen Transmission mehr durch diffuse Brechung an der rauhen Hautoberfläche wie durch Streuung an Partikeln hervorgerufen wird.

Das Melanin der Epidermis absorbiert kontinuierlich vom UV- bis in den sichtbaren Bereich des Spektrums und blockt, ähnlich einem Neutralglasfilter, zusammen

mit anderen Chromophoren der Haut etwa 20–50 % der ankommenden Strahlung. Bei Anwesenheit von Hämoglobin treten deutliche Absorptionsbanden bei 418 nm sowie 540–580 nm auf.

Ein Vergleich von totaler (überwiegend gestreutes Licht) und kollimierter Transmission (nicht-gestreutes Licht) zeigt, dass etwa 50 mal mehr Licht gestreut als nicht-gestreut wird. Etwa der gleiche Unterschied ist auch zwischen Streu- und Absorptionskoeffizienten zu beobachten.

Im UV wird die Schwächung von Licht überwiegend durch die Absorption von endogenen Chromophoren des Gewebes verursacht [AP81]. Die starke Absorption wirkt sich auf Remission und Transmission aus, die unterhalb 320 nm stark abfallen.

Im nahen IR sind Remission und Transmission sehr viel kleiner als im sichtbaren Bereich und zeigen deutliche Minima an den Absorptionsbanden des Wassers. Oberhalb etwa 1 μm und für kleine Dicken werden die optischen Eigenschaften der Haut deshalb näherungsweise durch eine mit Wasser gefüllte Küvette aus unbehandeltem Rohglas beschrieben [HHM56].

1.4 Auswirkungen auf die Fluoreszenzdiagnostik

Zusammenfassend soll hier der Einfluss der optischen Eigenschaften der Haut auf die Ausbreitung von Licht bei der FD diskutiert werden. Hierbei wird zwischen dem Eindringen von Anregungslicht in die Haut und der Emission von Fluoreszenzlicht aus der Haut unterschieden.

1.4.1 Eindringen von Licht in die Haut

Aufgrund des Brechungsindexunterschieds zwischen Luft ($n = 1$) und Haut ($n \approx 1,5$) wird ein geringer Anteil des Lichts an der Hautoberfläche reflektiert. Für senkrechten Einfall beträgt die (Fresnelsche) Reflexion 4 %. Da die Oberfläche des Stratum corneums nicht glatt und eben ist, wird das Licht in erster Linie diffus reflektiert und das restliche Licht unter verschiedenen Winkeln gebrochen, wodurch ein anfangs kollimierter Strahl beim Eintritt in die Haut aufgeweitet und diffuser wird. Zusätzlich wird der Querschnitt des Strahls durch die Brechung vergrößert, was zur Verminderung der Lichtintensität im Strahl führt.

Im Gewebe wird das Licht durch Absorption und Streuung abgeschwächt. Photonen, die aus dem Strahl herausgestreut werden, verbreiten sich in (zufällige) Richtungen,

die durch eine Phasenfunktion beschrieben werden können. Die Streuung der Photonen wird hervorgerufen durch Inhomogenitäten im Brechungsindex des Mediums (Streuzentren). Die Teilchendichte und Anordnung der Streuzentren variieren sehr stark in den einzelnen Hautschichten. Die Intensität und Richtungsabhängigkeit des gestreuten Lichts hängt von der Größe und Gestalt der Streuzentren relativ zur Wellenlänge des ankommenden Lichts und vom Unterschied im Brechungsindex zwischen dem Medium und den Streuzentren ab.

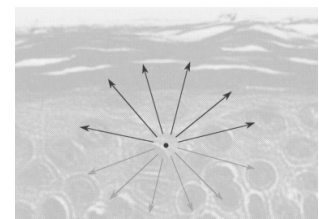
Zur Oberfläche zurückgestreute Photonen, die in einem Winkel zur Normalen der Oberfläche ankommen, der größer ist als der kritische Winkel für Totalreflexion werden ins Gewebe zurückreflektiert. Der Totalreflexionswinkel ist definiert durch $\arcsin 1/n$ und beträgt $41,8^\circ$ für $n = 1,5$. Durch die Rückstreuung von Photonen zur Hautoberfläche und die teilweise Totalreflexion dieser Photonen kommt es im oberen Teil der Epidermis zu einem Anstieg der Intensität eines einfallenden Lichtstrahls (Abb. 1.21). Hierbei erhöht sich die Intensität eines als unendlich ausgedehnt angenommenen Strahl in den ersten 100stel Millimetern etwa auf das Doppelte seiner ursprünglichen Intensität und fällt dann exponentiell mit zunehmender Hauttiefe ab [GJS89, JP87]. Liegt die Wellenlänge des verwendeten Lichts innerhalb der Absorptionsbanden von Blut, werden die Photonen in den Blutgefäßen absorbiert und die Intensität nimmt innerhalb des Gefäßplexus schnell ab.

Im Gewebe kann das Licht durch endogene Chromophore oder von außen zugeführte Farbstoffe absorbiert werden (Kapitel 2). Das wichtigste endogene Chromophor der Haut im sichtbaren Bereich des Spektrums ist Melanin.

Ein Vergleich von Absorptions- und reduziertem Streukoeffizient zeigt, dass die Streuung für die meisten Wellenlängen der weitaus wichtigere Schwächungsprozess ist und die Eindringtiefe von Licht beschränkt. Nur im UV (Proteine) und nahen IR (Wasser) oder an den Absorptionsbanden des Blutes muss für die Dosimetrie auch die Absorption beachtet werden.

1.4.2 Emission von Fluoreszenzlicht aus der Haut

Da es keine Strukturen im Gewebe gibt, die eine bestimmte Richtung bevorzugen, wird im Gewebe entstandenes Fluoreszenzlicht isotrop abgestrahlt. Geht man ferner davon aus, dass auch Absorption und Streuung in alle Richtungen gleich stark erfolgen, kann nur die zur Hautoberfläche hin abgestrahlte Hälfte des Fluoreszenzlichts das Gewebe verlassen (Abb.).



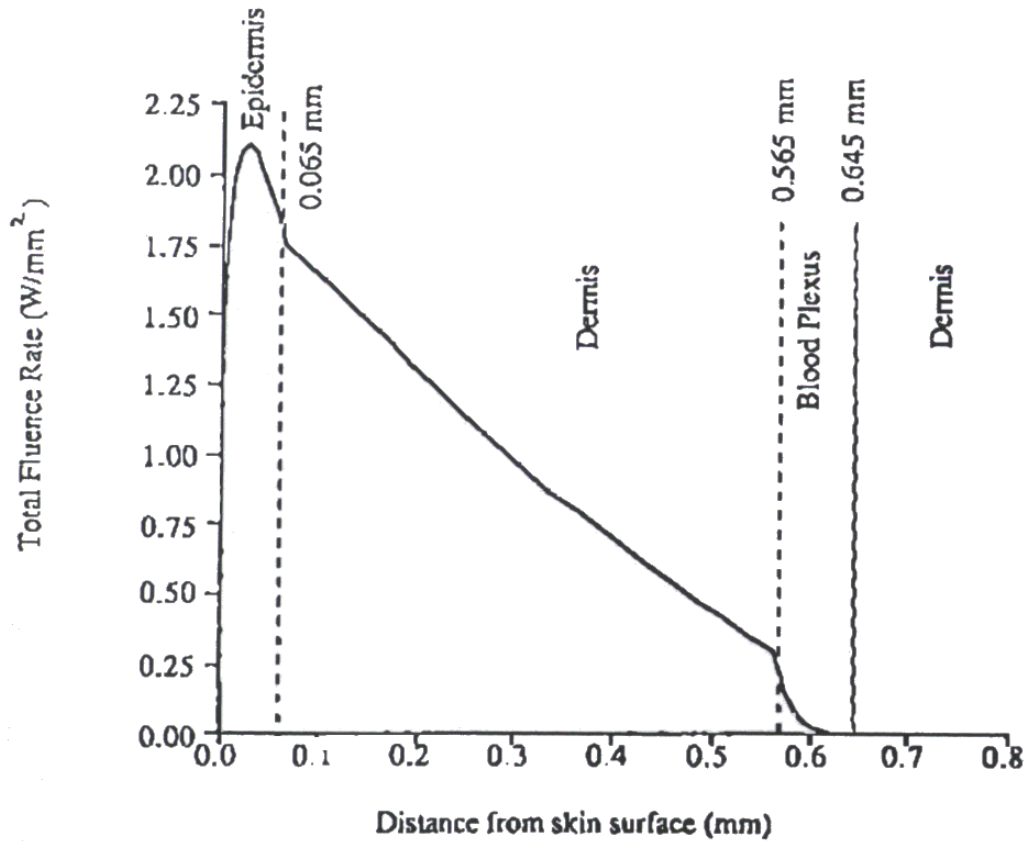
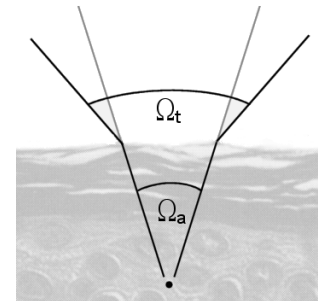


Abbildung 1.21: Verlauf der Intensität eines Lichtstrahls in Abhängigkeit von der Hauttiefe für ein 4-Schicht-Modell der Haut [GJS89]. Angenommen wird ein kollimierter, unendlich ausgedehnter Strahl mit einer ursprünglichen Intensität von $1 \text{ W}/\text{mm}^2$ mit einer Wellenlänge von 577 nm und folgenden optischen Parametern der einzelnen Hautschichten: Epidermis: Dicke $0,065 \text{ mm}$, $\mu_a = 3,8 \text{ mm}^{-1}$, $\mu_s = 50 \text{ mm}^{-1}$, $g = 0,786$; Dermis: Dicke $0,5 \text{ mm}$ (obere Dermis) und $0,3 \text{ mm}$ (untere Dermis), $\mu_a = 0,3 \text{ mm}^{-1}$, $\mu_s = 21,7 \text{ mm}^{-1}$, $g = 0,81$; Blut(gefäße): Dicke $0,08 \text{ mm}$, $\mu_a = 37,6 \text{ mm}^{-1}$, $\mu_s = 0,96 \text{ mm}^{-1}$, $g = 0$.

Die Fluoreszenzquantenausbeute (Verhältnis von absorbierten zu emittierten Photonen) der verwendeten Farbstoffe liegt bei etwa 10 % (siehe Abschnitte 2.5 und 2.4). Deshalb wird nur ein geringer Anteil der eingestrahlten Energie als Fluoreszenzphotonen wieder abgestrahlt. Ebenso wie das Anregungslicht ist auch die Fluoreszenz den Schwächungsprozessen im Gewebe ausgesetzt. Da sowohl die Absorption μ_a wie auch die Streuung μ_s mit steigender Wellenlänge abnehmen (s. Abb. 1.12), wird die mittlere freie Weglänge des Lichts $\text{MFP} = 1/\mu_t$ mit zunehmender Wellenlänge immer größer. Die Tiefe, aus der das Fluoreszenzlicht herausdringen kann, ist deshalb stets größer als die Eindringtiefe des Anregungslichts. Überlappen sich Absorptions- und Fluoreszenzspektrum des Farbstoffes, muss die Reabsorption des Fluoreszenzlichts durch den Farbstoff selbst beachtet werden. Bei höheren Konzentrationen kann es zur Fluoreszenzlöschung (Quenching) kommen, wenn sich die Elektronensysteme der Farbstoffmoleküle gegenseitig beeinflussen (s. Abschnitt 3.2.2).

Erreicht das Fluoreszenzlicht schließlich die Oberfläche wird ein kleiner Anteil aufgrund der (Fresnelschen) Reflexion wieder ins Gewebe zurückreflektiert. Schräg einfallendes Fluoreszenzlicht, dessen Einfallswinkel größer als der Totalreflexionswinkel ist, wird sogar zu 100 % an der Hautoberfläche reflektiert. Für vollständig diffuses Licht, das auf die Grenzschicht Haut | Luft trifft, wurde eine theoretische diffuse Rückreflexion von 55 % errechnet [GJS89].²⁸

Wegen des Übergangs vom optisch dichteren ins optisch dünnere Medium erfolgt die Brechung beim Austritt der Fluoreszenz aus der Haut vom Lot weg. Ein in den Raumwinkel Ω_a emittierter Lichtflux wird dadurch auf einen größeren Raumwinkel Ω_t verteilt, was nochmals zu einer Abnahme der Intensität führt (Abb.).



²⁸Da die Streuung mit $g = 0,7-0,9$ sehr stark vorwärts gerichtet ist, kann man davon ausgehen, dass Fluoreszenzlicht auch in der Nähe der Hautoberfläche nicht vollständig diffus ist. Deshalb wird vermutlich weitaus weniger Licht aufgrund der Totalreflexion ins Gewebe zurückreflektiert.

Größe	Symbol	Einheit	Wert	Bemerkungen
Absorptions- koeffizient	μ_a	cm^{-1}	≈ 6000	<i>SC</i> , 193 nm [WFM88]
			1,5	<i>E</i> , 633 nm [MCP92]
			≈ 16	<i>E</i> , 633 nm [WAP81] ^a
			2,8	<i>D</i> , 488 nm, Albino [JP87]
			1,8	<i>D</i> , 630 nm [ABM88]
			2,7	<i>D</i> , 633 nm [JAP87] ^d
			1,9	<i>D</i> , 633 nm [GDK93] ^c
			$< 1,0$	<i>D</i> , 633 nm [TB96]
			1,8	<i>D</i> , 635 nm [MBA89] ^d
			$\approx 3,5$	<i>D</i> , 635 nm [AP81] ^b
			0,07–0,2	<i>D</i> , 660 nm, [GDK93]
			23/6/2	<i>D</i> , 350/450/633 nm [Zra86]
			0,33/0,19/0,13	<i>D</i> , 633/700/900 nm [SKE98] ^e
			2,41/1,49/0,45	<i>D</i> , 633/700/900 nm, HT-VI [SKE98] ^e
			2,7/4,8	<i>D</i> , 700/1230 nm [GDK93] ^f
			8,1/1,7/1,7	<i>D</i> , 700/950/1230 nm, HT-VI [GDK93] ^f
			0,24/0,75/0,98	<i>D</i> , 749/789/836 nm [TPS96]
			2,3/0,7	<i>F</i> , 540/700–900 nm [PWP90] ^g
			0,13/0,09/0,12	<i>F</i> , 633/700/900 nm [SKE98] ^e
Streukoeffizient	μ_s	cm^{-1}	239	<i>D</i> , 488 nm, Albino [JP87]
			248	<i>D</i> , 630 nm [ABM88]
			187	<i>D</i> , 633 nm [JAP87]
			244	<i>D</i> , 635 nm [MBA89]
			145/130/90	<i>D</i> , 350/450/633 nm [Zra86]

SC = Stratum corneum, *E* = Epidermis, *D* = Dermis, *F* = Fettgewebe

HT-VI = Hauttyp VI (siehe Anhang A)

^a aus Spektren von Wan *et al.* [WAP81], transformiert mit Beziehungen aus Ref. [GJS89]

^b aus Spektren von Anderson u. Parrish [AP81], transformiert mit Beziehungen aus Ref. [GJS89]

^c aus Daten von Jacques *et al.* [JAP87]

^d durch Anwendung des Prinzips der Ähnlichkeit mit $g = 0,82$ [JAP87]

^e mit inverser Monto-Carlo-Simulation

^f aus Daten von Hardy *et al.* [HHM56] mit Monte-Carlo-Simulation ($g_{\text{HG}} = 0,91$; $\beta = 0,1$)

^g aus Fig. 6 in Ref. [PWP90]

Tabelle 1.5: Mikroskopische Parameter der menschlichen Haut.

Größe	Symbol	Einheit	Wert	Bemerkungen
Anisotropie- faktor	g		$\approx 0,9$	SC [BL84] ^{<i>h</i>}
			0,58–0,78	SC , 240–400 nm [EYS66] ^{<i>h</i>}
			0,71–0,78	E , 300–540 nm [BL84] ^{<i>h</i>}
			0,74	D , 488 nm, Albino [JP87]
			0,95	D , 630 nm [ABM88]
			0,81	D , 633 nm [JAP87]
			0,97	D , 633 nm [TB96]
			0,12/0,38/0,62	D , 350/450/633 nm [Zra86]
			0,715	lin. Regression [GJS89] ^{<i>i,h</i>}
			0,68	aus $\beta = 0,84$ [Dif83] ^{<i>k</i>}
			–	$g_E \approx g_D \approx 0,62 + \lambda 0,29 \times 10^{-3}$ (λ in nm) [GJS89]
Brechungsindex	n		1,55	SC [Sch64]
			1,45	SC [SL77]
			1,33–1,5	Wassergehalt 100–0 % [BL]
			1,37–1,5	[Dif83]
			1,4	[BPT89]

SC = Stratum corneum, E = Epidermis, D = Dermis, F = Fettgewebe

^{*h*} siehe dazu Abb. 1.13

^{*i*} aus Daten von Everett *et al.* [EYS66] mit $g = A + B\lambda$

^{*k*} aus Daten von Everett *et al.* [EYS66] mit $g = 2\beta - 1$

(β ist der vorwärts gerichtete Anteil des gestreuten Lichts, Ref. [Atk65])

Tabelle 1.6: Mikroskopische Parameter der menschlichen Haut (Fortsetzung).

Größe	Symbol	Einheit	Wert	Bemerkungen
reduzierter Streukoeffizient	μ_s'	cm^{-1}	– 24 62 70 35,5 23,8 11,6 44 9–14,5 128/80/35 21,3/7,1 27,3/23,2/16,3 32,1/26,8/18,1 20,6/17,3/10,6 23,1/22,8/15,9 10,3/8,6/7,9 12,6/12,1/10,8	Def.: $\mu_s' = (1 - g) \mu_s$ <i>E</i> , 633 nm [MCP92] <i>D</i> , 488 nm, Albino [JP87] <i>E</i> , 633 nm [WAP81] ^a <i>D</i> , 633 nm [JAP87] ^d <i>D</i> , 633 nm [GDK93] ^c <i>D</i> , 633 nm [TB96] <i>D</i> , 635 nm [MBA89] ^d <i>D</i> , 660 nm, <i>in vivo</i> [GDK93] <i>D</i> , 350/450/633 nm [Zra86] <i>D</i> , 700/1230 nm [GDK93] ^f <i>D</i> , 633/700/900 nm [SKE98] ^e <i>D</i> , 633/700/900 nm, HT-VI [SKE98] ^e <i>D</i> , 700/950/1230 nm, HT-VI [GDK93] ^f <i>D</i> , 749/789/836 nm [TPS96] <i>F</i> , 540/700/900 nm [PWP90] ^g <i>F</i> , 633/700/900 nm [SKE98] ^e
totaler Schwächungs- koeffizient	μ_t	cm^{-1}	– 242 250 190 405/271	Def.: $\mu_t = \mu_a + \mu_s$ <i>D</i> , 488 nm, Albino [JP87] <i>D</i> , 630 nm [ABM88] <i>D</i> , 633 nm [JAP87] <i>F</i> , 700/900 nm [PWP90]
effektiver Schwächungs- koeffizient	μ_{eff}	cm^{-1}	–	Def.: $\mu_{\text{eff}} = \sqrt{3\mu_a(\mu_a + \mu_s')}$
mittlere freie Weglänge	MFP	mm	–	Def.: $\text{MFP} = 1/\mu_t$
effektive Eindringtiefe	d_{eff}	mm	–	Def.: $d_{\text{eff}} = 1/\mu_{\text{eff}}$
Penetrations- tiefe	$d_{1/e}$	mm	– 0,6 1,2	Def.: $I(d_{1/e}) = 1/e \cdot I(0)$ 630 nm [HLB84] 630 nm [ABM88]

SC = Stratum corneum, *E* = Epidermis, *D* = Dermis, *F* = Fettgewebe

HT-VI = Hauttyp VI, siehe Anhang A

^a aus Spektren von Wan *et al.* [WAP81], transformiert mit Beziehungen aus Ref. [GJS89]

^c aus Daten von Jacques *et al.* [JAP87]

^d durch Anwendung des Prinzips der Ähnlichkeit mit $g = 0,82$ [JAP87]

^e mit inverser Monto-Carlo-Simulation

^f aus Daten von Hardy *et al.* [HHM56] mit Monte-Carlo-Simulation ($g_{\text{HG}} = 0,91$, $\beta = 0,1$)

^g aus Fig. 6 in Ref. [PWP90]

Tabelle 1.7: Abgeleitete, mikroskopische Parameter der menschlichen Haut.

Größe	Symbol	Einheit	Wert	Bemerkungen
Reflexion (Fresnelsche \sim)	R		– 0,04 0,04–0,07	Def.: $R = \frac{(n-1)^2}{(n+1)^2}$ für Luft→Medium $n = 1, 5$; senkrechter Einfall 250–3000 nm [PAU78, AHP80]
Remission	R_t		0,10/0,08 0,1–0,2 0,40/0,35	$E_{k.A.}$, 600 nm, kaukas./HT-VI [WAP81] $E_{40 \mu m}$, 400–700 nm [EYS66] $E+D_{k.A.}$, 600 nm, kaukas./HT-VI [WAP81]
Transmission	T		0,81/0,87 0,58/0,63 0,67/0,71 0,68/0,71 0,45–0,65 0,50/0,63 0,07/0,15 0,10/0,14 0,07/0,10 0,05/0,06 0,38/0,47	$E_{30 \mu m}$, 633/675 nm, Reg. abdominis $E_{24 \mu m}$, 633/675 nm, Reg. antebrachii $E_{32 \mu m}$, 633/675 nm, Reg. femoris $E_{35 \mu m}$, 633/675 nm, Reg. dorsi [KDW99] $E_{40 \mu m}$, 400–700 nm [EYS66] $E+D_{0,2 mm}$, 488/800 nm [JP87] ^{<i>l,m</i>} $E+D_{2,6 mm}$, 633/675 nm, Reg. abdominis $E+D_{1,5 mm}$, 633/675 nm, Reg. antebrachii $E+D_{2,2 mm}$, 633/675 nm, Reg. femoris $E+D_{4,1 mm}$, 633/675 nm, Reg. dorsi [KDW99] $F_{1,0 mm}$, 600/1000 nm [PWP90] ^{<i>o</i>}
kollimierte Transmission	T_c		0,010/0,024 0,013/0,044	$E+D_{0,2 mm}$, 488/800 nm [JP87] ^{<i>l</i>} $E+D_{0,6 mm}$, 488/800 nm [this work] ^{<i>n</i>}

SC = Stratum corneum, E = Epidermis, D = Dermis, F = Fettgewebe

kaukas./HT-VI = kaukasische Haut (Typ II u. III) im Gegensatz zu schwarzer Haut (Typ VI)

pigment./Vitiligo = pigmentierte Haut im Gegensatz zu pigmentloser Vitiligo-Haut

Reg. abdominis, antebrachii, femoris, dorsi = Bauch, Oberarm, Oberschenkel, Rücken

^{*l*} gemessen an Albino-BALB/c Mäusehaut

^{*m*} siehe dazu Abb. 1.15

^{*n*} siehe dazu Abb. 1.18

^{*o*} aus Fig. 5 in Ref. [PWP90]

Tabelle 1.8: Makroskopische Messgrößen an menschlicher Haut.

Kapitel 2

Endogene und exogene Farbstoffe

Die Lokalisation von Tumoren bei der Fluoreszenzdiagnostik (FD) geschieht mithilfe von Fluoreszenzfarbstoffen. Zur Anregung und Detektion der Fluoreszenz ist es notwendig, die spektralen Eigenschaften der verwendeten Farbstoffe genau zu kennen. Die beiden in dieser Arbeit untersuchten Farbstoffe, Protoporphyrin IX (PpIX) und Indocyaningrün (ICG) unterscheiden sich in ihren physikalischen und physiologischen Eigenschaften: PpIX entsteht erst im Gewebe aus 5-Aminolävulinsäure (ALA); durch verschiedene Mechanismen kommt es dabei in Tumorzellen zu einer stärkeren Produktion als in normalen Zellen und damit zur selektiven Anreicherung von PpIX in Tumoren. Nach topischer Applikation ist die Verteilung des Farbstoffes weitgehend auf die Epidermis beschränkt. Die maximale Absorptionsbande von PpIX liegt im blauen Teil des Spektrums, wo Licht nur sehr wenig in das Gewebe eindringen kann. ICG bindet nach intravenöser Gabe sehr schnell an Proteine im Blut und bleibt deshalb in den Gefäßen. Da die Gefäße in Tumoren sehr viel durchlässiger sind als im normalen Gewebe, kann der Farbstoff hier unter Umständen extravasieren und den Tumor damit markieren. Durch die Bindung an Plasmaproteine kann ICG nur in oder in der Nähe von Gefäßen angetroffen werden, ist also auf die Dermis beschränkt. Die Absorptions- und Emissionsbanden von ICG liegen im nahen IR, wo Licht sehr gut das Gewebe durchdringen kann.

Die Fluoreszenz wird durch endogene Chromophore im Gewebe beeinflusst. Zum einen emittieren diese Chromophore unter Anregung selbst Fluoreszenzlicht (Autofluoreszenz), das sehr breitbandig ist und deshalb die Emissionsbanden von exogenen Farbstoffen überlagern kann, und zum anderen schränkt die Absorption der Chromophore den nutzbaren Wellenlängenbereich zur Anregung von Farbstoffen ein.

2.1 Endogene Farbstoffe

Zu den endogenen Chromophoren der Haut zählen DNA, die Aminosäuren Tryptophan und Tyrosin, zahlreiche kleine aromatische Moleküle wie die Urocainsäure sowie Melanin und dessen Vorläufer. In der Dermis besitzen verschiedene Bestandteile des Blutes wie Hämoglobin, Oxyhämoglobin, Bilirubin und Carotine charakteristische Absorptionsbanden. Die starke Absorption von Epidermis und Stratum corneum bei Wellenlängen kleiner als 240 nm ist in erster Linie auf Peptidbindungen zurückzuführen.

2.1.1 Chromophore

Mit Ausnahme von Melanin und schwächeren Banden von Hämoglobin absorbieren die endogenen Chromophore der Haut ausschließlich im UV. Durch Überlagerung der einzelnen Emissionsspektren ist die Autofluoreszenz der Haut breitbandig vom ultravioletten bis in den sichtbaren Bereich des Spektrums verteilt.

DNA

Aufgrund ihrer Häufigkeit haben die Nucleinsäuren der DNA erheblichen Anteil an der Absorption und Fluoreszenz der Haut. Reine DNA zeigt eine Absorptionsbande um 260 nm (Abb. 2.1) sowie um 300 nm und 350 nm, die aber um eine bzw. vier Größenordnungen kleiner sind [SG81].

Zahlreiche *in vitro*-Untersuchungen haben gezeigt, dass durch UV-Exposition von DNA verschiedene Photoprodukte gebildet werden. Hierzu zählen u. a. Cyclobutanpyrimidin-Dimere, wie Thymin-Thymin und das (6-4)-Photoprodukt, bei dem benachbarte Pyrimidine über die 4-Carbongruppe des einen mit der 6-Carbongruppe des anderen Moleküls verbunden sind. Bei UV-Bestrahlung kann das (6-4)-Photoprodukt in sein Dewar-Photoisomer umgeformt werden [MK93], was auch an menschlicher Haut *in vivo* nachgewiesen werden konnte [CPN95]. Dadurch kann es zu Veränderungen des Absorptionsspektrums von DNA kommen, was im Falle des (6-4)-Photoprodukts und seines Dewar-Isomers zu einem Absorptionsmaximum bei 320 nm führt [MR87].

Tryptophan und Tyrosin

Die in Proteinen enthaltenen aromatischen Aminosäuren Tryptophan und Tyrosin zeigen wegen ihrer Ringstruktur und der darin auftretenden konjugierten Doppelbindungen Absorptionsbanden um 280 nm bzw. 275 nm (Abb. 2.1).

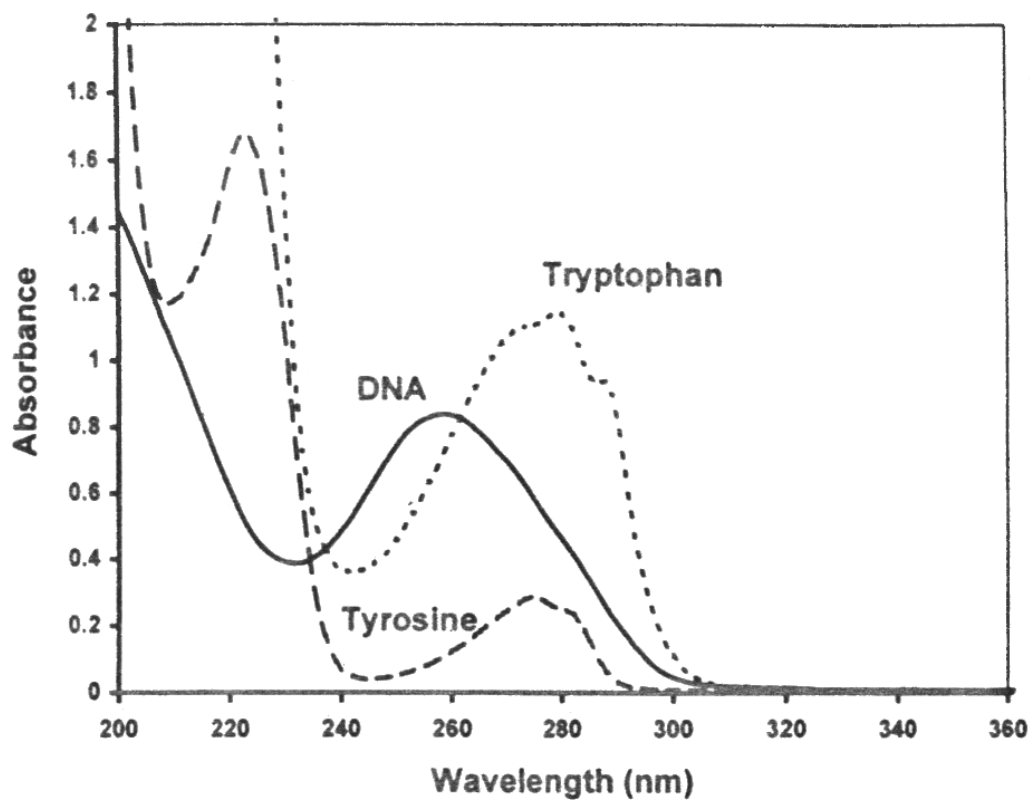
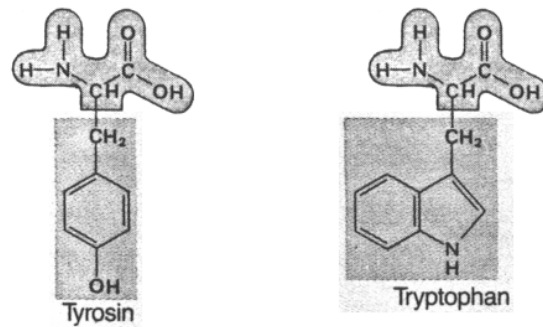


Abbildung 2.1: Absorptionsspektrum von DNA (Kälber-Thymus, Sigma D-3664, 4 % w/v in 10 mM Tris-HCl, pH 7) sowie für die aromatischen Aminosäuren L-Tryptophan (Sigma T-8659, 200 μ M in H₂O, pH 7,5) und L-Tyrosin (Sigma T8909, 200 μ M in H₂O, pH 7) [You97].



Das Fluoreszenzspektrum der beiden Aminosäuren zeigt eine breite Bande zwischen 330 nm und 360 nm, die bei Messungen der epidermalen Transmission zu einer beträchtlichen Überschätzung führen kann [AP81].

Urocainsäure

Die Urocainsäure entsteht bei der Zersetzung von Histidin, das mithilfe des Enzyms Histidase gespalten wird. Da die Histidase im Stratum corneum vorkommt, nicht aber die Urocanase, findet man im Stratum corneum sehr hohe Konzentrationen an Urocainsäure. Während an den meisten Lokalisationen am Körper Konzentrationen im Bereich 6–12 nmol/cm² gemessen werden, wird an den Solen ein überraschend hoher Wert von 62 nmol/cm² erreicht [KCN95].

Die Urocainsäure kann als *trans*- oder *cis*-Isomer vorliegen. Dabei ist die *trans*-Form das natürliche, in gesunder, nicht-bestrahlter Haut vorkommende Isomer; durch UV-Bestrahlung tritt eine *trans* → *cis* Photoisomerisierung ein (Abb. 2.2).

Die beiden Isomere zeigen in etwa vergleichbare Absorptionsspektren mit Banden um 270 nm, wobei die Absorption der *cis*-Form um etwa 20 % niedriger ist. Die Lage des Absorptionsmaximums und des photoisomeren Gleichgewichts ist stark vom pH-Wert abhängig. Das Verhältnis *cis*-/*trans*-Urocainsäure ist maximal für pH 5,5, was den Bedingungen in Haut sehr nahe kommt [LLP96]. Wegen der breitbandigen und starken Absorption im UVC und UVB wird die Urocainsäure auch als „endogene Sonnencreme“ bezeichnet [ZK53, EAB61].¹

¹Der UV-Bereich des elektromagnetischen Spektrums wird unterteilt in UVA (400–320 nm), UVB (320–290 nm) und UVC (< 290 nm). Während die Bildung des Melanins und damit der Schutz vor der gefährlichen UV-Strahlung in erster Linie durch das UVA induziert wird, schreibt man die karzinogene Wirkung mehr dem UVB- und UVC-Anteil zu.

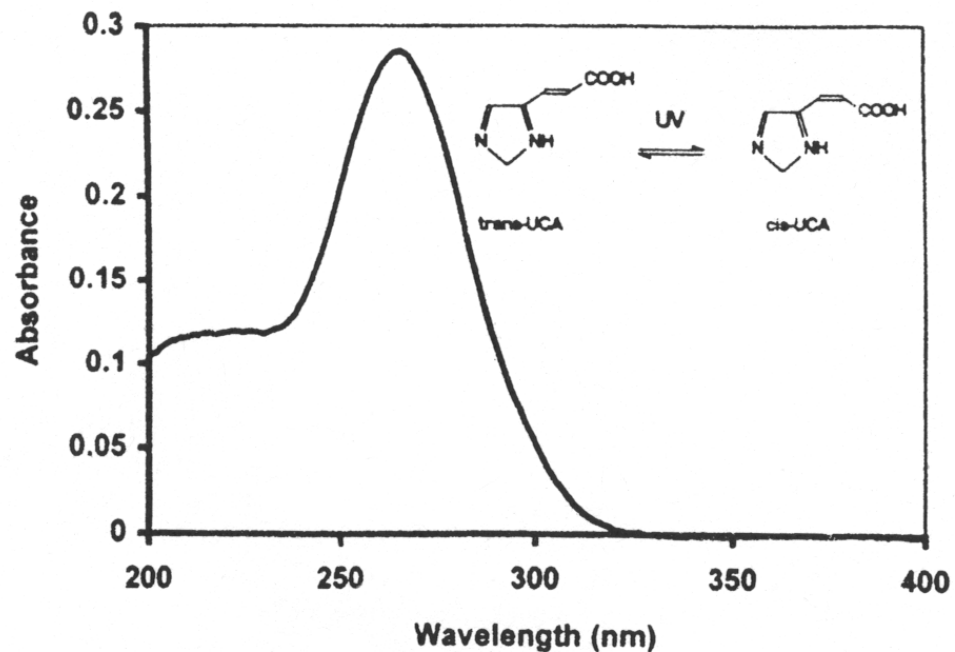
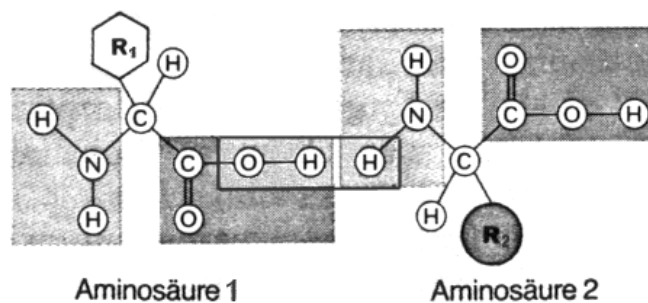


Abbildung 2.2: Absorptionsspektrum von trans-Uroicinsäure ($15 \mu\text{M}$ in H_2O , pH 5,7) sowie Strukturformeln der trans- und cis-Photoisomere [You97].

Peptidbindungen

Peptidbindungen entstehen, wenn die Carboxylgruppe einer Aminosäure mit der Aminogruppe einer anderen Aminosäure unter Abspaltung von Wasser reagiert.



Diese Verbindung absorbiert sehr harte UVC-Strahlung unterhalb 240 nm und trägt erheblich zur schützenden Wirkung von Stratum corneum und Epidermis bei.

Melanine

Melanine sind Polymerisationsprodukte der Aminosäure Tyrosin und als Protein-Polymer-Komplex erstaunlich stabil. Die Biosynthese der Melanine in den Melanozyten (*Melanogenese*) ist überaus komplex und noch nicht vollständig geklärt [Pro92]. Aus Tyrosin entsteht Dihydroxyphenylalanin (DOPA), das durch Oxidationen und Polymerisationen zu verschiedenen Melaninformen weiter verarbeitet wird. Man unterscheidet die unlöslichen, stickstoffhaltigen, schwarzen oder braunen *Eumelanine* und die alkalilöslichen, gelben bis rötlich-braunen *Phäomelanine*, die zusätzlich Schwefel enthalten. Die Mischung der verschiedenen Melanintypen ist Hauptursache der individuellen Haut- und Haarfarben. Photobiologisch wird die Haut des Menschen je nach Fähigkeit zur Bräunung in verschiedene Typen eingeteilt (s. Anhang A). Mit steigendem Hauttyp konnte ein Anstieg des Eumelaningehalts nachgewiesen werden, nicht jedoch für Phäomelanine [THW91].

Im Gegensatz zu den anderen Chromophoren besitzen Melanine keine Absorptionsbanden sondern absorbieren kontinuierlich von 250–1200 nm, wobei die Absorption zu kleineren Wellenlängen hin zunimmt (Abb. 2.3). Oberhalb von etwa 300 nm ist Melanin das einzige Chromophor in der Epidermis und bestimmt damit weitgehend das Absorptionsverhalten der Haut. Im nahen IR, oberhalb etwa 1100 nm, ist die Absorption durch Melanine zu vernachlässigen, wodurch die Transmission [HHM56] und Remission [JHM56, KH52] in diesem Wellenlängenbereich nicht mehr durch die Pigmentierung beeinflusst werden.

Chromophore im Blut

Zu den wichtigsten Chromophoren im Blut, und damit in der Dermis lokalisiert, zählen Hämoglobin, Oxyhämoglobin, Bilirubin und verschiedene Carotine.

Hämoglobin: Hämoglobin besteht aus vier Polypeptidketten, die der Tertiärstruktur des Myoglobins ähnlich sind.² Hämoglobin und seine oxygenierte Form, das Oxyhämoglobin zeigen jeweils eine starke Absorptionsbande im blauen und etwa um den Faktor 10 schwächere Banden im grün-gelben Bereich des Spektrums (Abb. 2.3). Die molaren Extinktionskoeffizienten ϵ an den Maxima bzw. Minima zeigen die Tabellen 2.1 und 2.2.

²Die vier Polypeptidketten des Hämoglobin sind aus zwei verschiedenen Sequenzen aufgebaut (2 α -Ketten mit 141 Aminosäuren, 2 β -Ketten mit 146 Aminosäuren); im Myoglobin besteht die Peptidkette aus 153 Aminosäuren, die die Farbstoffgruppe *Häm* mit Eisen als Zentral-Ion umgeben.

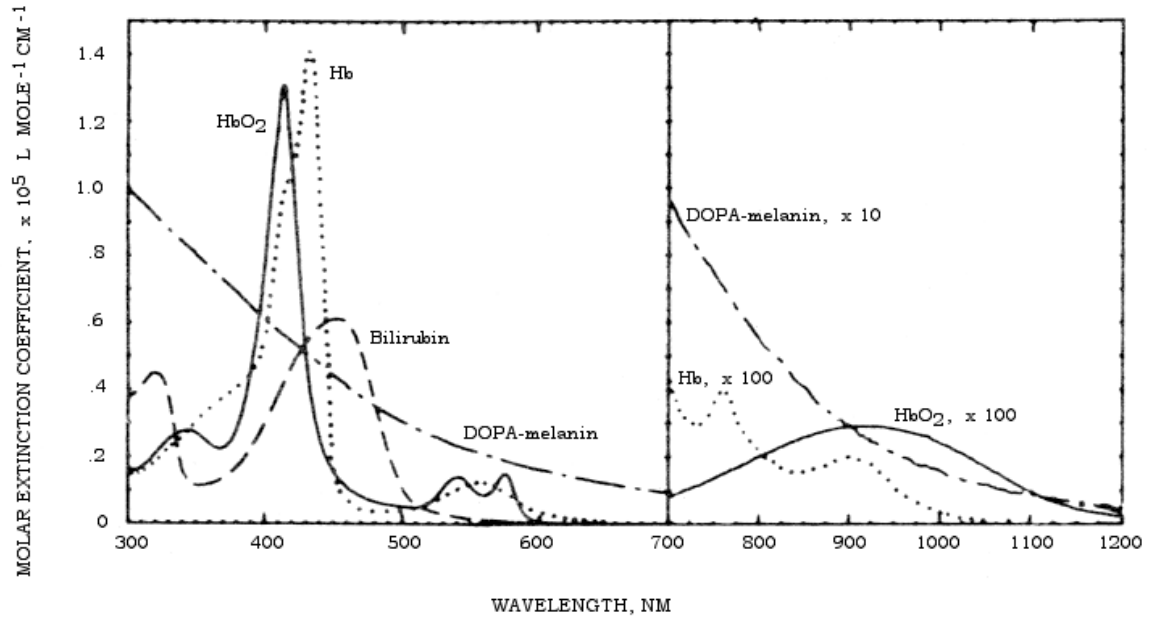


Abbildung 2.3: Absorptionsspektrum von DOPA-Melanin (in H_2O), Oxyhämoglobin HbO_2 (in H_2O), Hämoglobin Hb (in H_2O) und Bilirubin (in CHCl_3) [AP81]. Skalenänderungen im nahen IR beachten!

Bande	Wellenlänge (nm)	ϵ (Liter $\text{mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$)	Fehler $\Delta\epsilon$ (%)
Max^{UV}	431	$5,60 \times 10^5$	1,2
Min	478	$1,32 \times 10^4$	4,2
Max^{VIS}	554–556	$5,22 \times 10^4$	1,7

Tabelle 2.1: Molarer Extinktionskoeffizient von Hämoglobin [KZ65].

Bande	Wellenlänge (nm)	ϵ (Liter $\text{mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$)	Fehler $\Delta\epsilon$ (%)
Max ^{UV}	415	$5,24 \times 10^5$	2,4
Min	510	$1,90 \times 10^4$	1,7
Max ^{VIS}	543–541	$5,75 \times 10^4$	0,7
Min	560	$3,39 \times 10^4$	0,8
Max ^{VIS}	577	$6,15 \times 10^4$	0,6

Tabelle 2.2: Molarer Extinktionskoeffizient von Oxyhämoglobin [KZ65].

Bilirubin: Bilirubin ist ein Bestandteil des Blutes, der durch den Abbau von Hämoglobin entsteht und zeigt breite Banden um 320 nm und 450 nm in CHCl_3 (Abb. 2.3).

Carotine: Viele Carotine, insbesondere β -Carotin, zeigen eine ähnlich breite Absorptionsbande im Bereich 400–500 nm wie Bilirubin mit Maxima bei 466 nm und 497 nm in CHCl_3 .

2.1.2 Optisches Fenster

Zwischen den Absorptionsbanden von Hämoglobin (370–450 nm bzw. 530–580 nm) sowie Bilirubin (400–500 nm) im blauen und grünen Bereich des Spektrums und den ersten Absorptionsbanden des Wassers im nahen IR ($> 1,2 \mu\text{m}$) werden die größten Eindringtiefen von Licht in Gewebe erreicht, da hier nur mehr das Melanin der Epidermis absorbiert (vgl. Abb. 2.3) und die Streuung mit zunehmender Wellenlänge geringer wird.

Da die effektive Bestrahlung mit Licht zu diagnostischen oder therapeutischen Zwecken auf das Intervall von 600 nm bis etwa $1,2 \mu\text{m}$ beschränkt ist, wird dieser Bereich als *optisches* oder auch *therapeutisches Fenster* bezeichnet.

2.1.3 Autofluoreszenz

Unter Autofluoreszenz versteht man die Eigenfluoreszenz des Gewebes, die bei Anregung von endogenen Fluorophoren entsteht. Die wichtigsten Fluorophore der Haut sind in Tab. 2.3 aufgelistet; die zugehörigen Fluoreszenzspektren zeigt Abb. 2.4.

Fluorophor	Anregung (nm)	Emission (nm)	Herkunft
Tryptophan	275, 280 ^a	350	Proteine
Kollagen	335	390, 405 ^b	Bindegewebe
Elastin	360	410	Bindegewebe
NADH	340	440–460 ^b , 470	Atmungskette
FAD	450	520	Atmungskette
Melanin	UV-VIS	> 540 ^b	Melanozyten
Porphyrine	405	635	Hämbiosynthese, bakterielle Infektionen

NADH = Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid, reduzierte Form

FAD = Flavin-Adenin-Dinukleotid, oxidierte Form

UV-VIS = Ultravioletter bis sichtbarer Bereich des Spektrums

^aRef. [AP81]

^bRef. [Gro94]

Tabelle 2.3: *Endogene Fluorophore des Menschen [SSB98].*

Unter Anregung im UV erstreckt sich die Autofluoreszenz von 340 nm bis etwa 700 nm, wobei meist nur das Maximum im blauen und grünen Bereich des Spektrums (450–580 nm) auffällt [RS96] (Abb. 2.5). In blutdurchsetztem Gewebe treten wegen der Reabsorption von Fluoreszenzlicht durch Oxyhämoglobin deutlich geringere Emissionsintensitäten um 418 nm sowie 538 nm und 577 nm auf [AJS90a].

Das Prinzip der FD unter Verwendung der Autofluoreszenz beruht darauf, dass die Fluoreszenzintensitäten von gesundem und Tumorgewebe sich aufgrund der Konzentration (Tryptophan [PPD95, AEC96], Porphyrine [HW87, YYF97, SBB92]), der strukturellen Zusammensetzung (Kollagen, Elastin [LB96, ZCA96, HLM95]), verschiedener Aktivitäten in der Atmungskette (NADH, FAD [MNC88, SGS97]) oder physiologischer Merkmale (Verdickung von Epithel oder tumorüberlagerndem Gewebe, Blutvolumen) unterscheiden.

Insgesamt ist die Fluoreszenzintensität von normalem Gewebe bei Anregung nahe 400 nm im Bereich 450–550 nm höher als in benachbartem Tumorgewebe, im Bereich 600–700 nm hingegen niedriger, da bei Tumoren meist ein erhöhter Porphyringehalt vorhanden ist [SFC92, HSH99]. Da die spektrale Verteilung der Autofluoreszenz von den optischen Eigenschaften des Gewebes und dem Zusammenwirken verschiedener Fluorophore abhängt, werden zur Diagnostik meist aufwendige, spektroskopische Verfahren

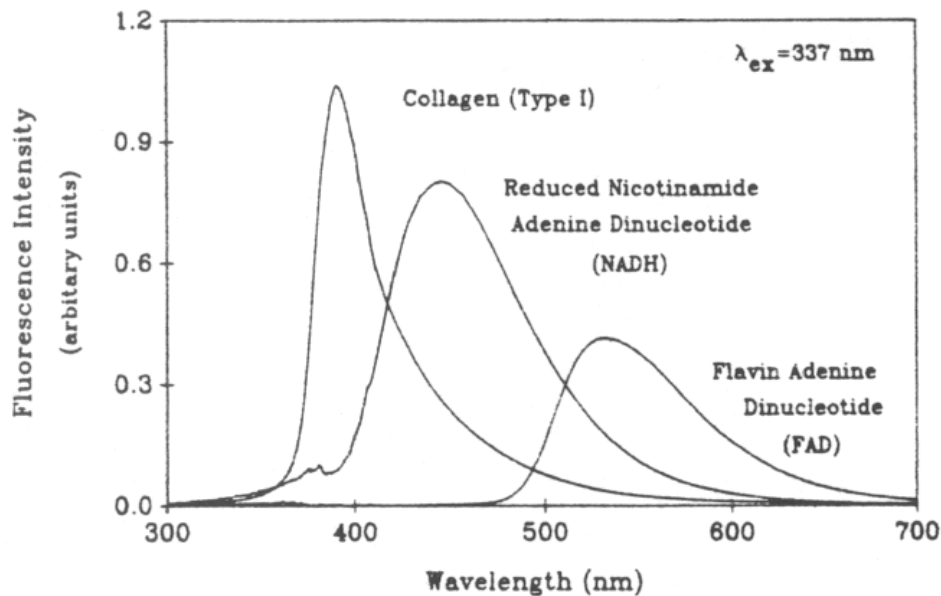


Abbildung 2.4: Fluoreszenzspektren von Kollagen (Typ I, kristallin), NADH (reduzierte Form, kristallin) und FAD (oxidierte Form, in Lösung mit pH 7,0) unter Anregung bei 337 nm [SFC92].

herangezogen. Hierbei werden durch Verhältnissbildung der Intensitäten bei verschiedenen Anregungs- und/oder Detektionswellenlängen die einzelnen Fluorophore unterschieden [SSF96, Ram00] und Einflüsse durch die Anregungs- und Detektionsgeometrie minimiert [KMA96, AEC96].

Auf die FD mithilfe der Autofluoreszenz des Gewebes wird in dieser Arbeit nicht näher eingegangen und auf obige Literatur verwiesen.

2.2 Exogene Farbstoffe

Der Kontrast zwischen gesundem und dysplastischem Gewebe bei der FD kann entscheidend verbessert werden, wenn exogene, d. h. von außen zugeführte Fluoreszenzfarbstoffe im Gewebe angereichert werden. Da diese Fluoreszenzfarbstoffe durch ihre speziellen photophysikalischen Eigenschaften das entsprechende Gewebe gegenüber Licht sensibler machen, werden sie auch als *Photosensibilisatoren* bezeichnet.

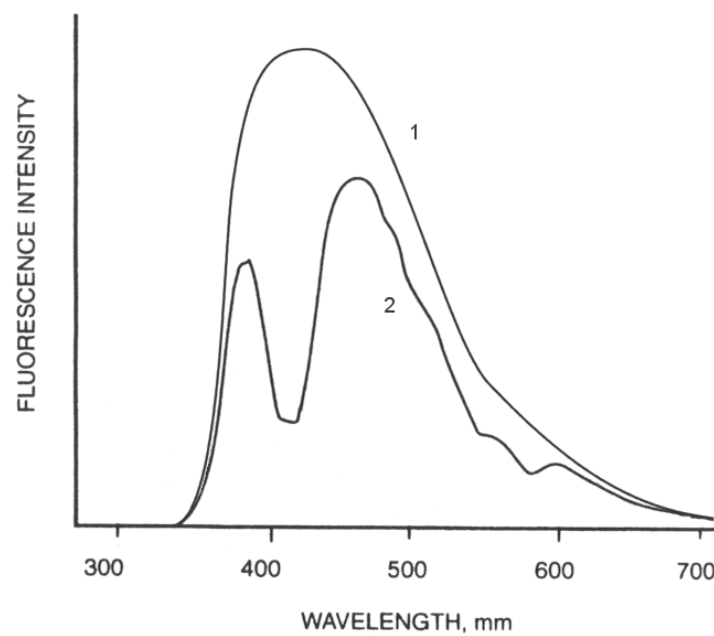


Abbildung 2.5: Spektrale Verteilung der Autofluoreszenz unter Anregung bei 308 nm. Das Emissionsmaximum für normales Gewebe (1) liegt zwischen 450 nm und 580 nm [RS96]; deutlich geringere Emission um 418 nm sowie 538 nm und 577 nm tritt für blutdurchsetztes Gewebe (2) wegen der Reabsorption von Fluoreszenzlicht durch Oxyhämoglobin auf [AJS90a].

2.2.1 Eigenschaften von Photosensibilisatoren

Ein für die FD idealer Photosensibilisator sollte folgende Kriterien erfüllen:

- Aufgrund des optischen Fensters sowie der abnehmenden Streuung im Gewebe mit steigender Wellenlänge sollte die maximale Absorption bzw. Emission möglichst im roten und nahen IR-Bereich liegen. Durch die begrenzte Eindringtiefe des Lichts ist die FD derzeit auf sehr oberflächliche Läsionen beschränkt, die deutlich weniger als 1 mm unter der Hautoberfläche lokalisiert sind.
- Der Farbstoff sollte sich möglichst selektiv im erkrankten Gewebe anreichern, um bei der FD einen hohen Kontrast zwischen normalem und krankem Gewebe zu erzielen und das gesunde Gewebe vor photo-oxidativen Effekten zu schützen.
- Der Farbstoff sollte eine möglichst hohe Fluoreszenzquantenausbeute besitzen, sodass die absorbierte Energie möglichst effizient wieder als Fluoreszenzlicht abgegeben wird (siehe Abschnitt 2.3.2).
- Um eine, mit einer systemischen³ Applikationsform verbundene, generalisierte Photosensibilisierung der Patienten zu vermeiden, sollte der Farbstoff topisch, d. h. lokal verabreicht werden können.
- Nach der Diagnostik sollte der Farbstoff möglichst schnell wieder aus dem Körper eliminiert werden. Bei topisch applizierten Stoffen kann dies durch eine rasche Metabolisierung in nicht-photosensibilisierende Substanzen (z. B. PpIX \rightarrow Häm) erreicht werden; bei systemisch applizierten Farbstoffen sollten die Plasmahalbwertszeiten möglichst gering sein und die Stoffe zügig ausgeschieden werden (z. B. ICG).
- Aufgrund der Zulassungsbestimmungen des Arzneimittel-Gesetzes sollten die verwendeten Photosensibilisatoren chemische Reinsubstanzen darstellen.
- Zu guter Letzt sollten der Farbstoff und seine Folgeprodukte nicht toxisch und für den Organismus gut verträglich sein. Dies schließt z. B. einige Rhodamine und Anthracen, die hervorragende Fluoreszenzquantenausbeuten von nahezu eins haben, aus.

³über den Blutkreislauf

2.2.2 Geschichtliche Entwicklung

Wie bei der PDT wurden für die FD anfangs Hämatoporphyrin-Derivate (HpD), chemisch nicht exakt definierte Porphyrin-Gemische, eingesetzt [AB42, FWM48, RWF55].⁴ Bei 15 Patienten mit bronchialen und ösophagealen Tumoren wurde unter Anregung mit violettem Licht rötliche Fluoreszenz festgestellt [LBO61].

HpD haben jedoch eine geringe Tumorselektivität und besitzen nur schwache Absorptionsbanden im roten Spektralbereich. Da HpD wegen des hohen Molekulargewichtes von ca. 900 g/mol die Haut nicht ausreichend penetrieren können [RWM94] müssen sie systemisch appliziert werden. Dadurch kommt es zu einer, bis zu mehrere Wochen anhaltenden, generalisierten Photosensibilisierung der Patienten gegenüber Licht [WSA88, LRS93, FVH96].

Daher werden immer noch Photosensibilisatoren auf ihre Wirksamkeit und Verträglichkeit bei der FD hin getestet. Dazu zählen Substanzgruppen wie Chlorine, Purpurine, Porphycene und Phthalocyanine [FMG95]. Jedoch zeigen die meisten Substanzen *in vivo* eine erhöhte Phototoxizität und geringe Tumorselektivität.

Die bisher vielversprechendste Substanz bei der FD ist 5-ALA, ein Vorläufer in der Hämbiosynthese. Durch die exogene Gabe von 5-ALA wird der Feedback-Mechanismus der Hämbiosynthese umgangen und die Akkumulation von Porphyrinen, insbesondere Protoporphyrin IX (PpIX), in dysplastischem Gewebe induziert [KP92, PBM97]. Die entstandenen Porphyrine werden rasch wieder abgebaut [RSS97] und es sind nur wenige Nebeneffekte bekannt [WKF97].

Durch die Absorptionsbande von PpIX um 405 nm können jedoch nur sehr oberflächliche Tumoren detektiert werden. Zudem kann es durch die Hämbiosynthese zu großen interindividuellen Unterschieden in der detektierten Fluoreszenzintensität kommen.

Ein Farbstoff, der diese Nachteile nicht hat, ist Indocyaningrün (ICG). Die maximale Absorption von ICG in Blutplasma liegt bei 805 nm, die maximale Fluoreszenzemission bei 835 nm [SHB69, BK78, BD90]. Zudem sind von ICG keine Nebenwirkungen bekannt [BQB89, HYG94].

⁴HpD sind Mixturen verschiedener Porphyrine, deren optimale Zusammensetzung für die PDT und FD oft empirisch ermittelt wird und deshalb nicht exakt angegeben werden kann; Photofrin (QLT Pharmamedicals, Vancouver, Kanada) und Photosan-3 (Seehof Laboratories, Weselbreuer Koog, Deutschland) sind speziell für den klinischen Einsatz als Photosensibilisatoren entwickelte Produkte, die über den Handel erhältlich sind.

2.2.3 Wirkungsmechanismen

Physiologische Voraussetzung für die Wirksamkeit der FD und PDT ist die Anreicherung des Photosensibilisators in neoplastischem Gewebe mit möglichst großer Selektivität gegenüber dem gesunden Gewebe.

Da die benutzten Photosensibilisatoren in der Regel organische Farbstoffe sind, haben sie ähnliche elektronische Konfigurationen. Der Grundzustand der Farbstoffmoleküle ist ein Singulett-Zustand (Gesamt-Elektronenspin $S=0$). Bei der Bestrahlung mit Licht absorbieren die Farbstoffmoleküle die eintreffende Energie und werden vom Grundzustand (1S_0) in einen energetisch höheren Singulett-Zustand (1S_1 , 1S_2) oder dessen Schwingungs- und Rotationsniveaus angeregt (Abb. 2.6). Aus diesen angeregten Zuständen erfolgt meist innerhalb von sehr kurzer Zeit (10^{-12} – 10^{-13} s) durch interne Konversion ein strahlungsloser Übergang in das erste angeregte Singulett-Niveau.

Vom ersten angeregten Singulett-Zustand 1S_1 aus kann das Farbstoffmolekül durch mehrere, miteinander konkurrierende Prozesse in den Grundzustand relaxieren: (1) Unter Abstrahlung von *Fluoreszenzlicht* gelangt das Farbstoffmolekül in den Grundzustand oder dessen Schwingungs- und Rotationsniveaus. (2) Durch *interne Konversion* kann die Energie strahlungslos in Form von Wärme abgegeben werden und das Farbstoffmolekül schließlich den Grundzustand erreichen. (3) Durch Spin-Bahn-Kopplung ist ein Übergang in den Triplett-Zustand 3S_1 (Gesamt-Elektronenspin $S=1$) möglich (*intersystem crossing*), von dem aus das Farbstoffmolekül strahlungslos oder durch Phosphoreszenz in den Grundzustand relaxiert.

Fluoreszenz

Physikalische Grundlage der FD ist die Relaxation der Farbstoffmoleküle unter Emission von Fluoreszenzlicht. Wegen der sehr schnellen strahlungslosen Relaxation (interne Konversion und Schwingungsrelaxation) von höher angeregten Singulett-Zuständen in den Schwingungsgrundzustand des ersten angeregten Zustandes (1S_1) geht die Fluoreszenz in der Regel vom 1S_1 -Niveau aus.⁵ Die Wahrscheinlichkeit, mit der die Relaxation in den Grundzustand unter Emission von Fluoreszenzlicht geschieht, wird als *Fluoreszenzquantenausbeute* ϕ_F bezeichnet und ist definiert durch

⁵Allgemein wird diese Beobachtung durch die Regel von Kasha [Kas50] wiedergegeben:

Die Emission von Licht erfolgt unabhängig vom Anregungsprozess ausschließlich vom niedrigsten angeregten elektronischen Zustand der jeweiligen Multiplizität.

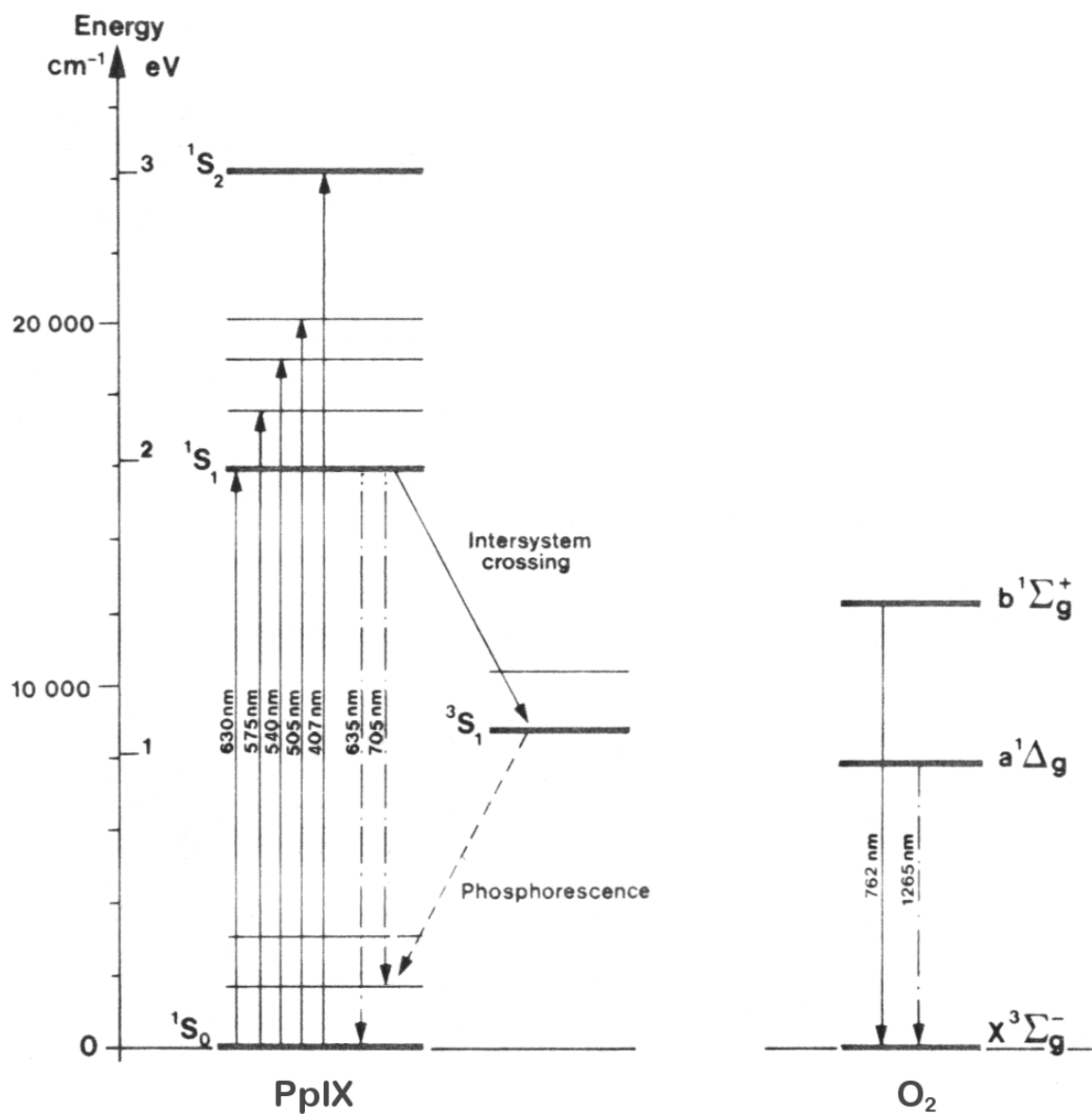


Abbildung 2.6: Energieniveau-Schema (Jablonski-Diagramm) für Protoporphyrin IX und molekularen Sauerstoff [Bou86, WSH93].

$$\phi_F = \frac{\text{emittierte Photonen}}{\text{absorbierte Photonen}} \quad \text{mit} \quad 0 \leq \phi_F \leq 1. \quad (2.1)$$

Da die Relaxation in den Grundzustand oder in dessen Schwingungs- und Rotationszustände erfolgen kann und diese Zustände zudem durch Kollisionen und elektrostatische Wechselwirkungen verbreitert sind, treten bei vielen Farbstoffen mehrere, breite Fluoreszenzbanden auf. Die relative Besetzung der einzelnen Niveaus gibt der Boltzmannfaktor $e^{-\Delta E/k_B T}$ an, wobei ΔE die Energiedifferenz zum Grundzustand, k_B die Boltzmann-Konstante und T die absolute Temperatur ist.

Die mittlere Lebensdauer des ersten angeregten Singulett-Zustandes liegt für die meisten Farbstoffe im Bereich 10^{-7} – 10^{-10} s, wodurch die Abklingzeit der Fluoreszenz ebenfalls im Nanosekunden-Bereich liegt. Durch die Verbreiterung der Absorptions- und Emissionsbanden eines Farbstoffes ist eine Überlappung der beiden Spektren möglich, was die Reabsorption von Fluoreszenzlicht durch die Farbstoffmoleküle selbst zur Folge hat.

Interne Konversion

Bei der strahlungslosen Deaktivierung eines angeregten Zustandes wird die elektronische Anregungsenergie in Schwingungs- oder Rotationsenergie des Moleküls umgewandelt und durch Energietransfer an seine Umgebung abgegeben. Die Übergangsrate k_{IC} für diesen Prozess liegt für Porphyrine bei etwa 10^6 s^{-1} .

Intersystem crossing

Obwohl nach quantenmechanischen Auswahlregeln verboten, kann durch molekulare Eigenschaften wie Spin-Bahn-Kopplung, schwere Atome oder das verwendete Lösungsmittel begünstigt auch ein Übergang $^1S_1 \rightarrow ^3S_1$ in den Triplett-Zustand des Farbstoffmoleküls mit Wechsel der Multiplizität (Gesamt-Elektronenspin ändert sich von $S = 0$ auf $S = 1$) stattfinden [HW93]. Die Wahrscheinlichkeit für diesen Übergang wird als *Triplettquantenausbeute* ϕ_T bezeichnet.

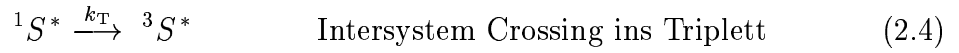
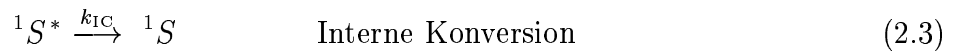
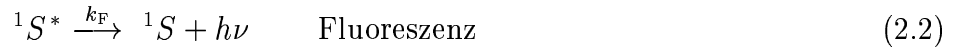
Ausgehend vom Triplett-Niveau 3S_1 kann das Photosensibilisatormolekül seine Energie auf das Substrat oder molekularen Sauerstoff übertragen (*photodynamischer Effekt*), was zu irreversiblen Zellschädigungen führt (siehe Abschnitt 2.2.4).

Bedingt durch das Interkombinationsverbot $^3S_1 \rightarrow ^1S_0$ ist das Triplett-Niveau im Vergleich zum Singulett-Niveau relativ stabil. Je nach Umgebung des Farbstoffmoleküls

beträgt die mittlere Lebensdauer des Zustandes etwa $10^{-3} - 10^0$ s. Die Relaxation in den Grundzustand kann durch interne Konversion oder Phosphoreszenz erfolgen, wobei die Abklingdauer der Phosphoreszenz ($\approx 10^{-4}$ s) aufgrund der langen Lebensdauer des Triplett-Niveaus deutlich länger ist als die der Fluoreszenz.

Photophysikalische Größen

Da die betrachteten Relaxations-Mechanismen



(2.5)

parallel ablaufen, gilt für die jeweiligen Übergangswahrscheinlichkeiten die Beziehung

$$\phi_F + \phi_{IC} + \phi_T = 1. \quad (2.6)$$

Bei Kenntnis der beiden Quantenausbeuten ϕ_F und ϕ_T kann die experimentell nicht zugängliche Quantenausbeute für den strahlungslosen Übergang $^1S_1 \rightarrow ^1S_0$ also berechnet werden: $\phi_{IC} = 1 - (\phi_F + \phi_T)$.

Die Lebensdauer τ des ersten angeregten Zustandes ist festgelegt durch die Gesamt-Übergangsrate $k = k_F + k_{IC} + k_T$ in der Form

$$\tau = \frac{1}{k} = \frac{1}{k_F + k_{IC} + k_T}. \quad (2.7)$$

Da neben der Fluoreszenzemission auch stets strahlungslose Relaxationsprozesse ablaufen, ist die natürliche Strahlungslebensdauer τ_{rad} größer als die beobachtete Fluoreszenzabklingzeit τ_F und kann berechnet werden durch

$$\tau_F = \phi_F \tau_{\text{rad}}. \quad (2.8)$$

2.2.4 Photodynamische Therapie

Die photodynamische Therapie (PDT) ist ein Verfahren zur Behandlung von oberflächlichen Läsionen, bei dem ein Farbstoff (Photosensibilisator) möglichst selektiv im Gewebe angereichert und mithilfe von Licht angeregt wird. Durch Energietransfer können dabei reaktive Sauerstoffspezies entstehen (*photodynamischer Effekt*), die äußerst zytotoxisch wirken und eine sekundäre Tumornekrose bewirken [LRS93, SCK96, PBM97].

Ausgangspunkt für die PDT sind Wechselwirkungen des Photosensibilisators im Triplett mit Substratmolekülen (*Typ I*) und molekularem Sauerstoff (*Typ II*) [Foo68, Bou86]. Ermöglicht werden die Wechselwirkungsprozesse durch die relativ lange Lebensdauer des Triplett-Niveaus.

Bei Typ-I-Reaktionen werden durch direkten Elektronen- oder Wasserstofftransfer Radikale des Substrates gebildet. Diese wiederum können mit molekularem Sauerstoff reagieren und Sauerstoff-Radikale (HO^\bullet , O_2^\bullet) erzeugen, die eine Schädigung der Zellen bewirken [Jor80].

Bei Reaktionen vom Typ II wird die Energie direkt auf molekularen Sauerstoff (Grundzustand $^3\text{O}_2$ ist ein Triplett) übertragen. Dabei entsteht Singulett-Sauerstoff ($^1\text{O}_2^*$), der durch Oxidation von Zellbestandteilen, insbesondere Membranen zytotoxisch wirkt [WGD76, Val87, GRM88]. Die Lebensdauer von Singulett-Sauerstoff beträgt in H_2O $3,5 \mu\text{s}$ und in D_2O $65 \mu\text{s}$. Singulett-Sauerstoff kann durch den strahlenden Übergang bei 1265 nm direkt nachgewiesen werden (Abb. 2.6) [GR92].

Beide Reaktionsmechanismen können gemeinsam ablaufen, wobei das Verhältnis abhängig ist vom verwendeten Photosensibilisator, der subzellulären Lokalisation und dem Substrat- und Sauerstoffangebot im Umfeld [MBP89]. Untersuchungen deuten darauf hin, dass bei Porphyrinen die Typ-II-Reaktion bevorzugt abläuft und der dabei entstehende Singulett-Sauerstoff der entscheidende Faktor für den Erfolg der PDT ist [SRH82, Lin91].

Da beide Reaktionstypen vom Triplett-Zustand des Photosensibilisators ausgehen, ist die Triplettquantenausbeute ϕ_T unter anderem ein Maß für die Wirksamkeit des Photosensibilisators bei der PDT. Während ϕ_T bei der PDT möglichst groß sein sollte, ist für die FD ein möglichst kleines ϕ_T wünschenswert, da sich dies sonst gemäß Gl. (2.6) zu Lasten der Fluoreszenzquantenausbeute ϕ_F auswirkt.

2.3 Messung von spektralen Eigenschaften

Die spektralen Eigenschaften der beiden untersuchten Farbstoffe Indocyaningrün (Abschnitt 2.4) und Protoporphyrin IX (Abschnitt 2.5) wurden unter Verwendung der folgenden Methoden bestimmt.

2.3.1 Absorption

Die Messung der Absorption erfolgte mit einem Einstrahl-Spektrophotometer (DU-640, Beckman Instruments, München), das für die Benutzung von Küvetten mit 0,001–5 cm Dicke adaptiert worden war. Bei allen Messungen wurde die Transmission relativ zum jeweiligen Lösungsmittel bestimmt.

Um den Fehler bei Absorptionsmessungen möglichst klein zu halten, sollte die Wahl der Küvettendicke d und der Farbstoffkonzentration c so erfolgen, dass für die Transmission $T = e^{-\sigma c d N_A}$ und die optische Dichte $D = \epsilon c d$ folgende Relationen erfüllt sind [KZ65]:

$$20 \% < T < 80 \% \quad \text{oder} \quad 0,090 < D < 0,700 \quad (2.9)$$

Der Absorptionsquerschnitt σ_{abs} wurde mit dem Lambert-Beerschen Gesetz ermittelt:

$$\sigma_{\text{abs}} [\text{cm}^2] = -\frac{\ln T \cdot 1000}{c d N_A} \quad (2.10)$$

Dabei sind die Konzentration c in mol/Liter und die Küvettendicke d in cm einzusetzen. Der Faktor 1000 kommt durch die Umrechnung $1 \text{ Liter} = 1 \text{ dm}^3 = 1000 \text{ cm}^3$ zustande.

2.3.2 Fluoreszenz

Da die meisten Spektrofluorimeter für die Messung von Farbstoffen, die wie Indocyaningrün im langwelligen Spektralbereich emittieren, aufgrund des Detektors oder einer 90°-Anordnung zu wenig empfindlich und unzureichend korrigiert sind, wurden sämtliche Fluoreszenzmessungen mit dem in Abb. 2.7 gezeigten Aufbau durchgeführt. Die Detektion der Fluoreszenz erfolgte dabei an der Vorderseite der Probe (*front-face fluorescence collection technique*) [SFS77], da diese Methode Reabsorptionseffekte minimiert und Messungen bis zu sehr hohen Farbstoffkonzentrationen erlaubt [PPB96].

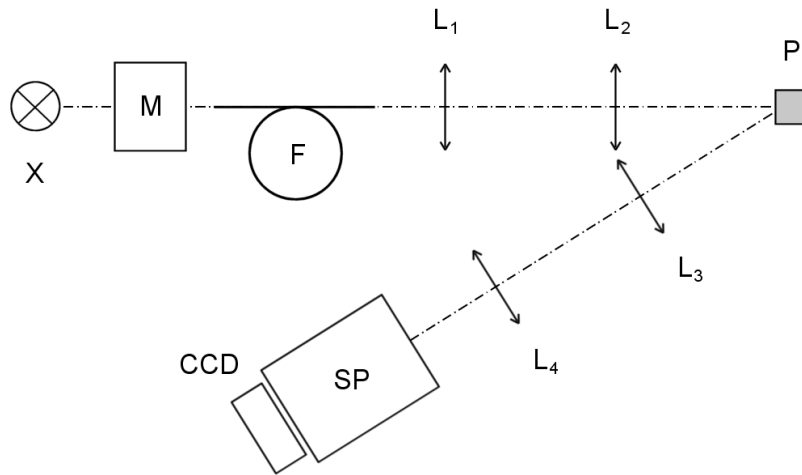


Abbildung 2.7: Versuchsaufbau zur Messung der Fluoreszenzquantenverteilung und Quantenausbeute. **X** Xenon-Lampe; **M** Monochromator; **F** Lichtwellenleiter; **L₁**, **L₂**, **L₃**, **L₄** Linsen. **P** Probe. **SP** Spektrometer. **CCD** CCD-Detektor.

Zur Anregung der Farbstoffe wurde das Licht einer Xenon-Lampe (Modell 110, Instruments S.A., München) mittels eines Monochromators (DH-10, Instruments S.A., München) diskriminiert und in einen Lichtwellenleiter (Quarzglas, Ø 5 mm) eingekoppelt. Nach Wiederaustritt wurde das Strahlenbündel mithilfe zweier Linsen auf die Probe fokussiert, sodass ein kreisrunder (Ø 6 mm), homogener Lichtfleck an der Vorderseite der Probe beobachtet werden konnte. Entstandenes Fluoreszenzlicht wurde durch zwei weitere Linsen auf den Eingang eines Spektrometers (270-M, Instruments S.A., München) abgebildet und von einem angeschlossenen CCD-Detektor (MTECCD-1024x128-6, Instruments S.A., München) spektral aufgelöst. Die Detektion der Fluoreszenz erfolgte dabei unter einem Winkel von 26° zur optischen Achse des Anregungslichts in einem Raumwinkel von etwa 3×10^{-2} sr. Die spektrale Empfindlichkeit des Detektionssystems wurde kalibriert mit einer Halogen-Lampe (Osram HLX64625, 10 W, 12 V) mit bekannter Farbtemperatur (3450 K bei 12 V Spannung) [BP90].

Zur absoluten Berechnung der Fluoreszenzverteilungen $E(\lambda)$ und der Quantenausbeuten $\phi_F = \int_{\text{em}} E(\lambda) d\lambda$ aus den gemessenen Fluoreszenzsignalen wurden die in Tabelle 2.4 angegebenen Farbstoffe mit bekannter Quantenausbeute als Referenzen verwendet. Die Berechnung erfolgte unter Berücksichtigung der spektralen Eigenschaften des Detektionssystems (siehe Anhang C).

Farbstoff	Referenz	ϕ_R
Indocyaningrün	HITCI ^a /Methanol	0,12 ^b
Protoporphyrin IX	Rhodamin 6G/Methanol	0,98 ^c

^a1,1',3,3',3',3'-Hexamethylindotricarbocyanin-Iodit
^bRef. [SSM88]
^cRef. [PL87]

Tabelle 2.4: Referenzfarbstoffe zur absoluten Berechnung der Fluoreszenzverteilungen $E(\lambda)$ und Quantenausbeuten ϕ_F in den Abschnitten 2.4 und 2.5.

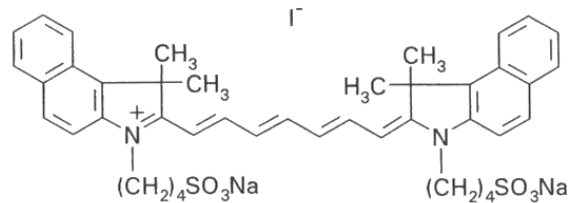


Abbildung 2.8: Strukturformel von Indocyaningrün-Natriumiodid (ICG-NaI, Molekulargewicht 925 g/mol).

2.4 Indocyaningrün

Indocyaningrün (ICG) ist ein hydrophiler, anionischer, dunkelgrün-blauer Tricarbo-cyanin-Farbstoff (Strukturformel siehe Abb. 2.8), der von den Kodak Research Laboratories entwickelt [Bro55, FBH57] und 1956 erstmals vorgestellt wurde [FBH56].

Seither wird ICG in der medizinischen Diagnostik [FW60] zur Bestimmung des Plasmavolumens [BB68], Messung des Herz-Zeit-Volumens [FW60, KGK68, SBK77, HH86], chorioidalen Angiographie [CB76, FH76, BK78], Überprüfung der exkretorischen Leberfunktion [LSL67, LLH79, GSN84], pharmakokinetische Untersuchungen [PPK70, AP90, FFP91, BMH89], Lokalisierung von Objekten im Gewebe [CKH93] und Fluoreszenzsondierung von Enzymen und Proteinen [KHJ75, SII86] verwendet. Zudem kann ICG beim Verschweißen von Gewebe mit nahem IR-Licht [LOC91, TPS93, DFF92], zur Photoklerose [LOC91], Photocoagulation [RPD94] und photo-oxidativen Schädigung von Tumorzellen *in vitro* [BAK99] und *in vivo* [AKB98] eingesetzt werden.

2.4.1 Pharmakokinetik

Die Pharmakokinetik von ICG ist detailliert untersucht worden [CSL60, STK96]. Nach systemischer Gabe bindet ICG zu 98 % an Serumproteine [Bak66, Muc76], wodurch eine Extravasation in das Gewebe verhindert wird. ICG wird sehr schnell und ausschließlich durch die Leber eliminiert und ohne chemische Veränderungen über die Galle ausgeschieden [Ott98]. Die Plasmahalbwertszeit im Menschen beträgt nur etwa 3 Minuten [PPK70].

2.4.2 Stabilität

Bei Absorptionsmessungen wurde eine zeitliche Veränderung von ICG beobachtet [GSN70, Owe73, LKM76, HSS86], bei der die Stabilität des Farbstoffes mit abnehmender Konzentration geringer wurde [GSN70, LKM76].

Mit steigender Konzentration bildet ICG-NaI in wässriger Lösung [PPB96] leicht Dimere und Oligomere, während es in Methanol [PPB96] und Dimethylsulfoxid (DMSO) [HMP98] bis zu hohen Konzentrationen als Monomer stabil bleibt. In humanem Blutplasma bindet ICG an Proteine [Bak66, Muc76] und bleibt so bis zu Konzentrationen von etwa $5 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$ in monomerer Form stabil [PPB96, HMP98].

Bei hohen Konzentrationen ($C \gtrsim 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$) werden in wässriger Lösung [Bak66, LKM76, RWP97, HMP98] und Blutplasma [Bak66] nach etwa 10 Tagen J-Aggregat-ähnliche⁶ [Jel36, Sch37] Absorptionsbanden bei 890 nm beobachtet. Die Bildung der J-Aggregate ist bei hohen Temperaturen deutlich größer [RWP97]. Selbst hochkonzentrierte Lösungen von J-Aggregaten, die bei Raumtemperatur im Dunkeln aufbewahrt wurden, erwiesen sich als äußerst stabil [PPB96].

2.4.3 Spektrale Eigenschaften

Das Absorptionsverhalten von ICG wurde bereits in wässriger Lösung [FW60, Bak66, SHB69, SHN70, GSN70, GSN70, SS71, TCG73, Owe73, PPB96], salziger Lösung [Owe73,

⁶J-Aggregation ist ein, bei verschiedenen konzentrierten, wässrigen Cyaninlösungen häufig zu beobachtendes Phänomen [Jel36, Sch37, Her77, Mob95] und wurde ausführlich für 1,1'-Diethyl-2,2'-Quinocyanine (Pseudo-Isocyanine) untersucht [RDG81, KK82, SDT88, BW89, GGL94, MTM94]. Für Pseudo-Isocyanin-J-Aggregate werden hohe Fluoreszenzquantenausbeuten [FKT77, DM87, SDT88, SGG88, BW89, GDP91] und stark von der Anregungsintensität abhängiges Fluoreszenzquenching [SDT88, SGG88, GDP91] berichtet.

LKM76], humanem Blutplasma [FW60, SHN70, GSN70, SS71, LKM76] und humanem Serum-Albumin [SHN70, GSN70, PPB96] untersucht. Die Fluoreszenzquantenausbeute von ICG ändert sich, wenn der Farbstoff an Makromoleküle wie Proteine oder Enzyme gebunden ist [KHJ75, SII86, PPB96]. ICG wird deshalb auch als diagnostischer Marker bei medizinischen und biologischen Anwendungen verwendet [KHJ75, SII86]. Einige Untersuchungen zur Fluoreszenzquantenausbeute sind in Ref. [INO90] angegeben; absolute Messungen gibt es in Wasser, Methanol und wässriger Albumin-Lösung [PPB96]. Bei Anwesenheit von wasserlöslichen Stickstoffverbindungen [PAB91] und Wasserstoff-Peroxiden [IOI88] wird Fluoreszenzquenching beobachtet.

In eigenen Messungen wurde das Absorptions- und Emissionsverhalten von Indocyaningrün-Natriumiodit (ICG-NaI) in Wasser, Ethanol und Hamster-Blutplasma in Abhängigkeit von der Konzentration untersucht.⁷

a) Material und Methoden

Indocyaningrün-Natriumiodit (ICG-Pulsion, Pulsion, München; Strukturformel siehe Abb. 2.8) wurde ohne zusätzliche Reinigung verwendet. Das Absorptionsspektrum gab keine Hinweise auf Verunreinigungen des Farbstoffes.

Die Messung der spektralen Eigenschaften wurden mit den in Abschnitt 2.3.2 beschriebenen Methoden und Versuchsanordnungen durchgeführt.

b) Ergebnisse

Abb. 2.9–2.11 zeigen die Absorptionsquerschnitte von ICG-NaI in Wasser (Abb. 2.9), Ethanol (Abb. 2.10) und Blutplasma (Abb. 2.11) für verschiedene Konzentrationen. Die durchgezogene Linie repräsentiert jeweils die niedrigste Farbstoffkonzentration. Die Absorptionsmaxima lagen bei $\lambda_{\text{max}} = 779 \text{ nm}$ (Wasser), 787 nm (Ethanol) und 804 nm (Blutplasma). Mit steigender Konzentration veränderten sich die Spektren aufgrund von Farbstoff-Farbstoff-Wechselwirkungen.

In wässriger Lösung (Abb. 2.9 (oben)) deutet das Absorptionsspektrum bis zu einer Konzentration von $C \approx 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$ auf die Bildung von Dimeren hin [For51, Par68,

⁷Grund für die Verwendung von Hamster-Blutplasma waren die *in vivo*-Untersuchungen in Kapitel 3, bei denen der zeitliche Verlauf der Fluoreszenz von ICG mit verschiedenen Methoden verglichen wurde; das Plasma wurde aus dem Blut (Hämatokrit 0,48) von mehreren Syrischen Goldhamstern nach 10 minütigem Zentrifugieren bei 2000 min^{-1} gewonnen.

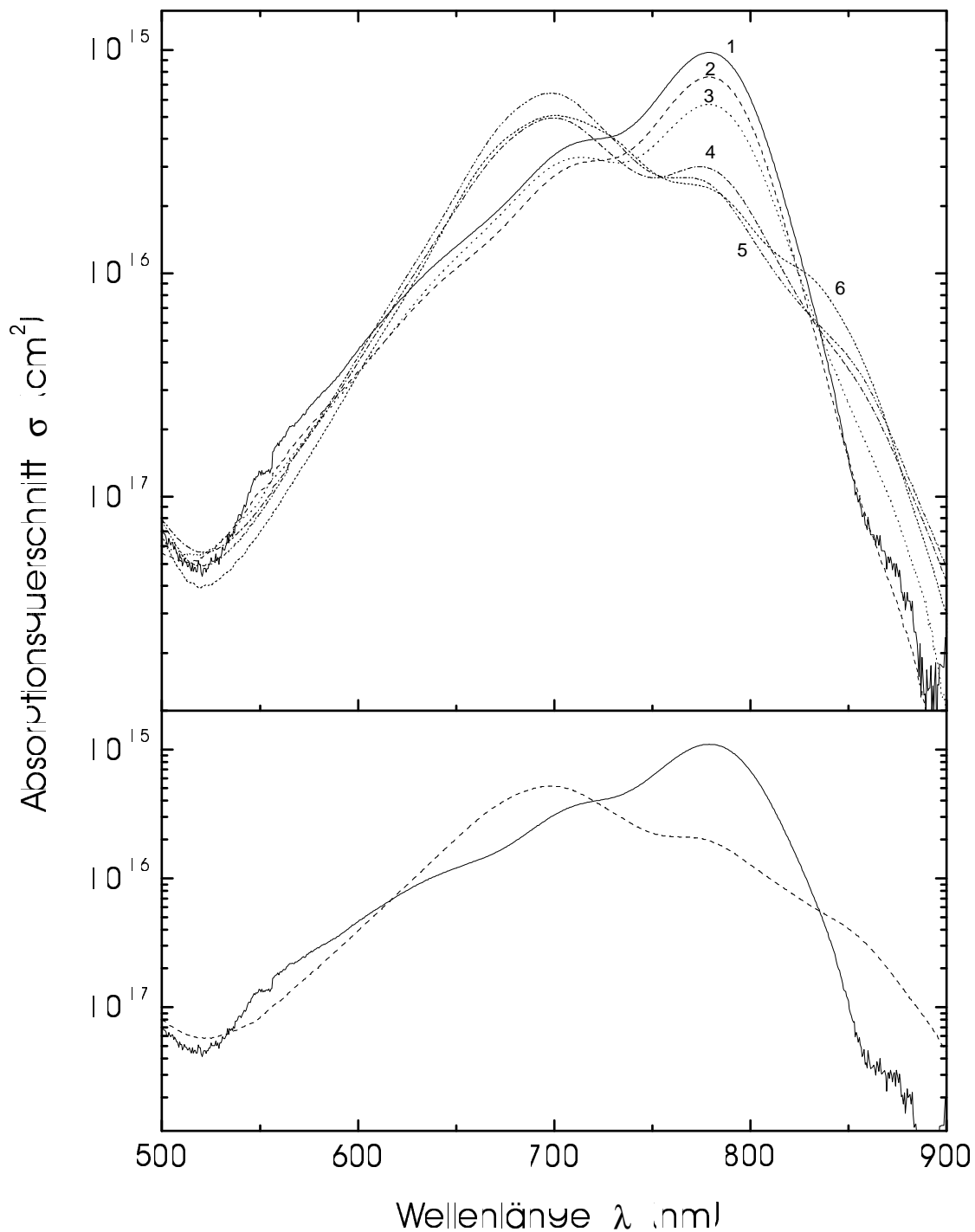


Abbildung 2.9: Oben Absorptionsquerschnitt von ICG-NaI in destilliertem Wasser für verschiedene Farbstoffkonzentrationen (mol dm^{-3}): (1) 2×10^{-7} ; (2) 1×10^{-6} ; (3) $1,3 \times 10^{-5}$; (4) 8×10^{-5} ; (5) $2,5 \times 10^{-4}$; (6) $1,4 \times 10^{-2}$. Unten Absorptionsquerschnitt von ICG-NaI in Wasser für Monomere (durchgezogene Linie) und Dimere (gestrichelte Linie) (Erläuterungen siehe Text).

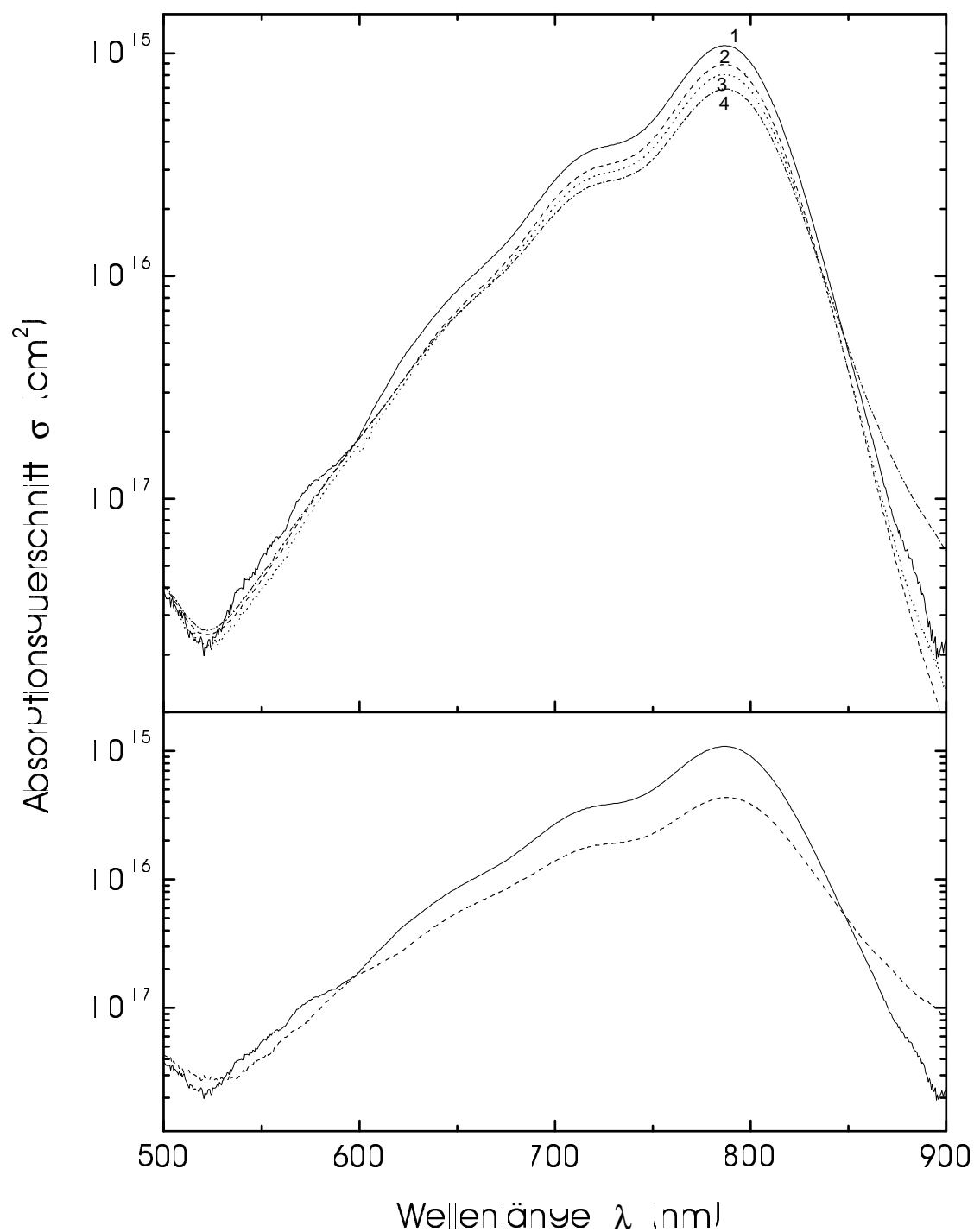


Abbildung 2.10: Oben Absorptionsquerschnitt von ICG-NaI in Ethanol für verschiedene Farbstoffkonzentrationen (mol dm^{-3}): (1) $2,2 \times 10^{-7}$; (2) $8,6 \times 10^{-6}$; (3) $1,3 \times 10^{-4}$; (4) 1×10^{-2} . Unten Absorptionsquerschnitt von ICG-NaI in Ethanol für Monomere (durchgezogene Linie) und eng benachbarte Moleküle (gestrichelte Linie).

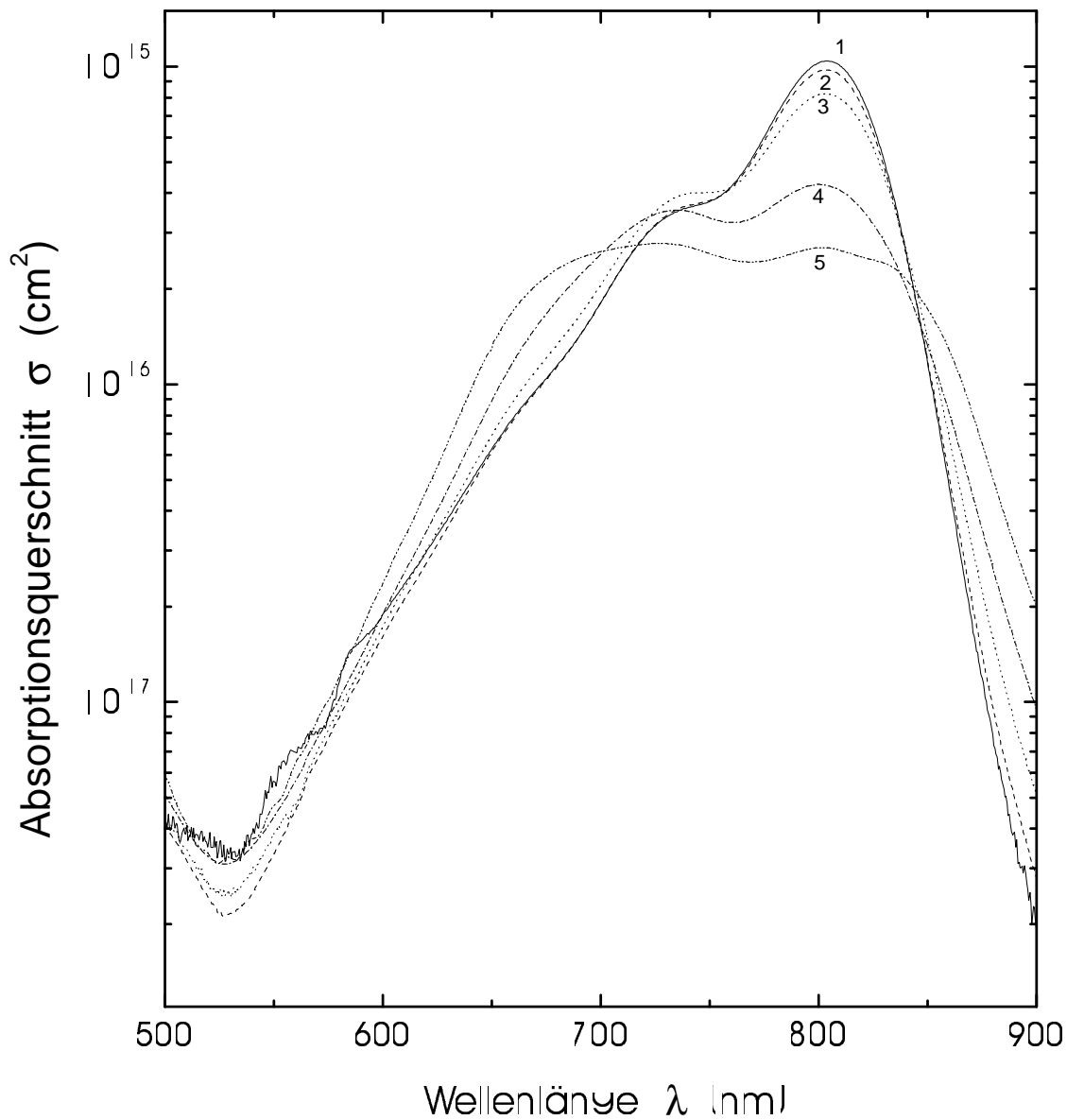


Abbildung 2.11: Oben Absorptionsquerschnitt von ICG-NaI in Blutplasma für verschiedene Farbstoffkonzentrationen (mol dm^{-3}): (1) $1,6 \times 10^{-7}$; (2) $5,8 \times 10^{-5}$; (3) $2,3 \times 10^{-4}$; (4) $1,4 \times 10^{-3}$; (5) $1,1 \times 10^{-2}$.

LP86]. Oberhalb dieser Konzentration zeigt sich zunehmend die Bildung von höheren Oligomeren.

In Ethanol (Abb. 2.10 (oben)) scheint die Affinität zwischen Farbstoff und Lösungsmittel die Bildung von Dimeren bis zu $C \approx 10^{-2} \text{ mol dm}^{-3}$ zu verhindern. Mit steigender Konzentration wird das Absorptionsspektrum aber durch das Auftreten von eng benachbarten Paaren (*closely spaced pairs*) beeinflusst [For51, LP86]. Der mittlere Abstand zwischen den Farbstoffmolekülen beträgt dabei für $C = 1 \times 10^{-2} \text{ mol dm}^{-3}$ nur etwa $d = 6,1 \text{ nm}$ ($d = (0,74 C N_A)^{-1/3}$; 0,74 ist der Volumenanteil einer hexagonal dichtesten Kugelpackung).

In Blutplasma (Abb. 2.11) bleibt die Monomer-Absorption bis zu einer Konzentration von $C \approx 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$ nahezu unverändert. Die Farbstoffmoleküle sind vorrangig an Plasmaproteine gebunden. Bei hohen Konzentrationen ($C \gtrsim 2 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$) zeigt das Spektrum das Auftreten von höheren Oligomeren an.

Die Abb. 2.12–2.14 zeigen die Fluoreszenzquantenverteilungen $E(\lambda)$ für verschiedene Konzentrationen von ICG-NaI in Wasser (Abb. 2.12), Ethanol (Abb. 2.13) und Blutplasma (Abb. 2.14). In allen Fällen wird die Fläche unter der Fluoreszenzquantenverteilung ($\int_{\text{em}} E(\lambda) d\lambda = \phi_F$) mit steigender Konzentration kleiner (Dimer-Bildung in Wasser, Wechselwirkungen von eng benachbarten Paaren in Ethanol, Mehrfach-Adsorption von Farbstoffmolekülen an Proteine).

Die Fluoreszenzquantenausbeuten ϕ_F in Abhängigkeit von der Konzentration für die drei Lösungen sind in Abb. 2.15 gezeigt. Die Quantenausbeuten der Monomere bei niedrigen Konzentrationen sind $\phi_F = 0,026 \pm 0,005$ (Wasser), $0,082 \pm 0,005$ (Ethanol) und $0,094 \pm 0,005$ (Blutplasma). Die insgesamt niedrigen Quantenausbeuten der Monomere deuten auf überwiegend nicht-strahlende Übergänge $^1S_1 \rightarrow ^1S_0$ (Interne Konversion) hin. Untersuchungen zum Intersystem crossing von ICG zeigen vernachlässigbar kleine Übergangsraten ins Triplett (Triplettquantenausbeute $\phi_T = k_{\text{isc}} \tau_F < 0,01$ [RPG97]; k_{isc} ist die Rate des Intersystem crossing, τ_F die Fluoreszenz-Lebensdauer). Bei hohen Konzentrationen werden die Fluoreszenzquantenausbeuten sehr klein, was auf einen verstärkten, nicht-strahlenden Zerfall von angeregten Aggregaten hinweist.

c) Aggregation

Mit steigender Konzentration müssen Aggregationseffekte betrachtet werden. Die drei untersuchten Systeme (ICG-NaI in Wasser, ICG-NaI in Ethanol und ICG-NaI in Blutplasma) haben ein unterschiedliches Aggregationsverhalten:

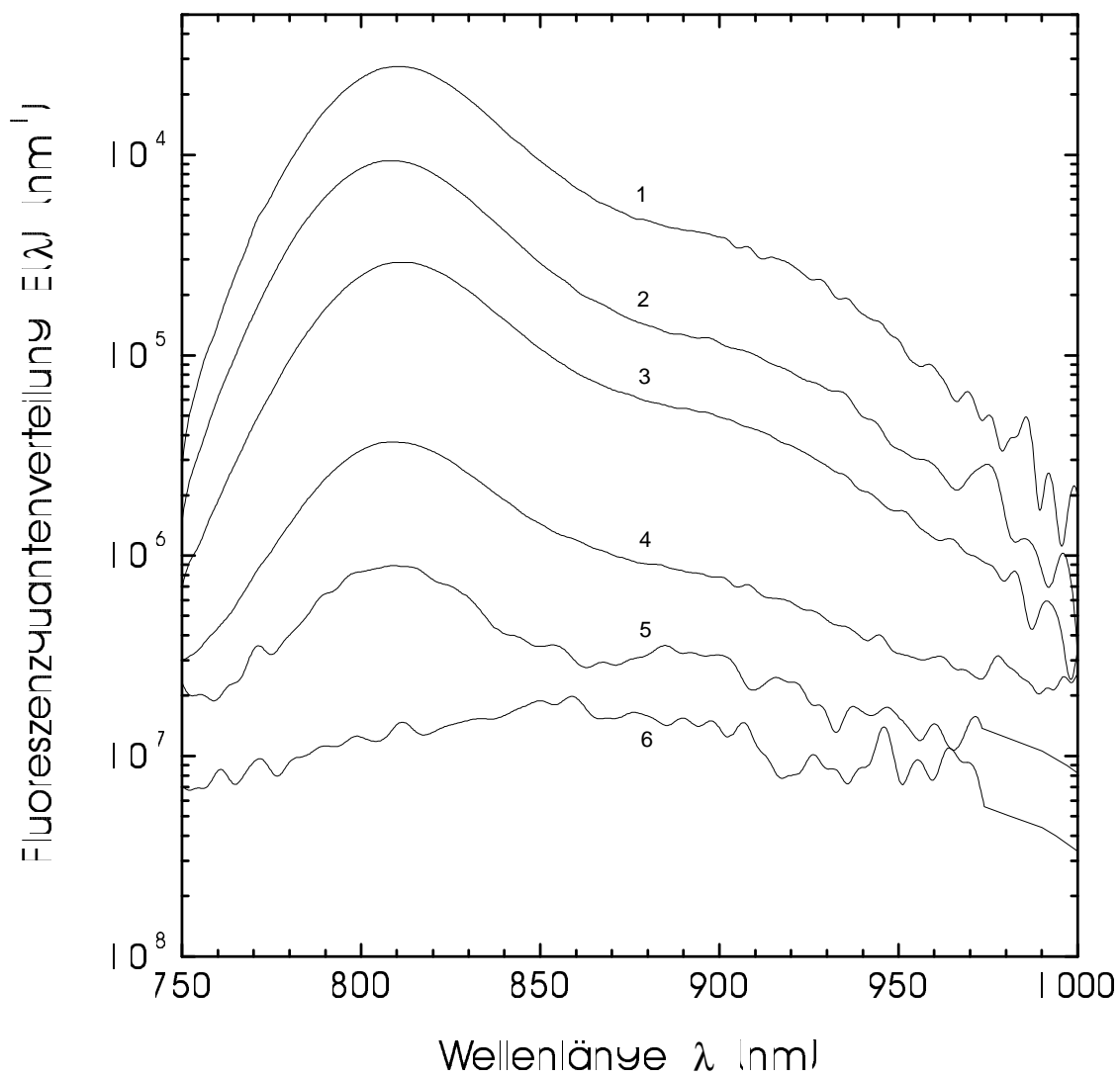


Abbildung 2.12: Fluoreszenzquantenverteilung $E(\lambda)$ von ICG-NaI in Wasser für verschiedene Farbstoffkonzentrationen (mol dm^{-3}): (1) 2×10^{-7} ; (2) $7,1 \times 10^{-6}$; (3) 5×10^{-5} ; (4) $2,5 \times 10^{-4}$; (5) $1,3 \times 10^{-3}$; (6) 1×10^{-2} .

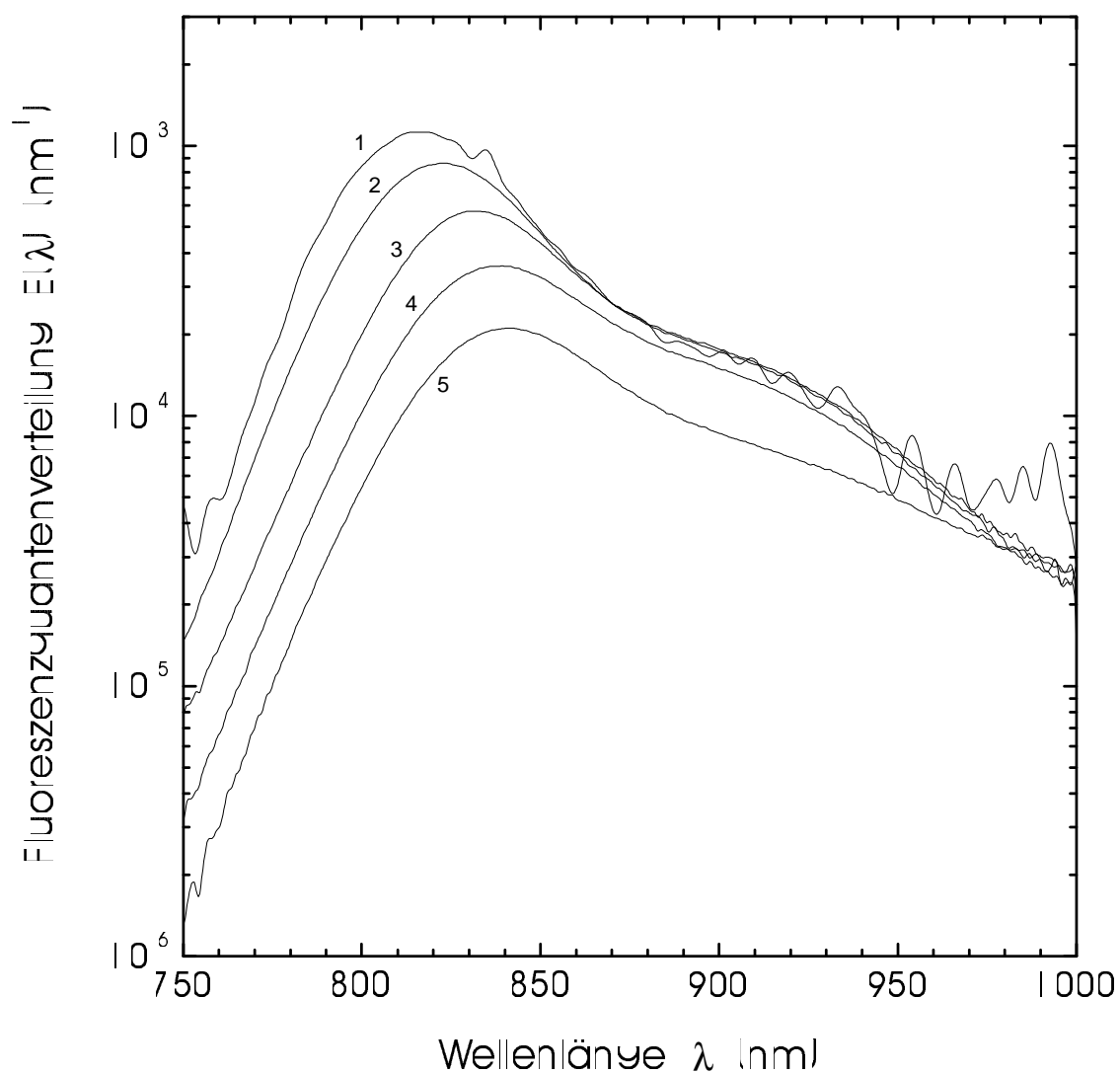


Abbildung 2.13: Fluoreszenzquantenverteilung $E(\lambda)$ von ICG-NaI in Ethanol für verschiedene Farbstoffkonzentrationen (mol dm^{-3}): (1) 2×10^{-7} ; (2) $2,6 \times 10^{-5}$; (3) $1,3 \times 10^{-4}$; (4) $1,3 \times 10^{-3}$; (5) 1×10^{-2} .

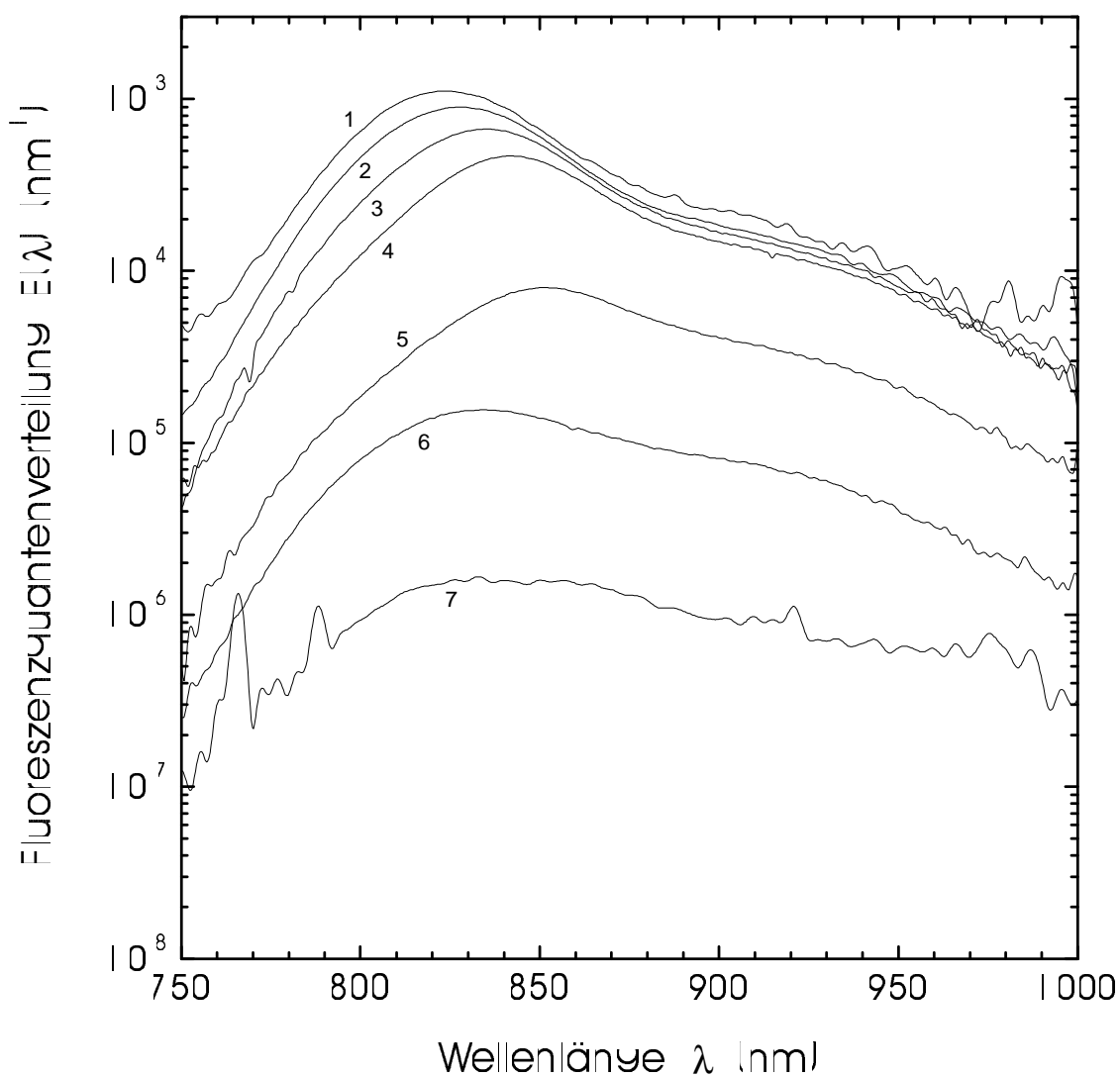


Abbildung 2.14: Fluoreszenzquantenverteilung $E(\lambda)$ von ICG-NaI in Blutplasma für verschiedene Farbstoffkonzentrationen (mol dm^{-3}): (1) $1,6 \times 10^{-7}$; (2) $2,8 \times 10^{-6}$; (3) $9,6 \times 10^{-6}$; (4) $5,8 \times 10^{-5}$; (5) $2,3 \times 10^{-4}$; (6) $1,4 \times 10^{-3}$; (7) $1,1 \times 10^{-2}$.

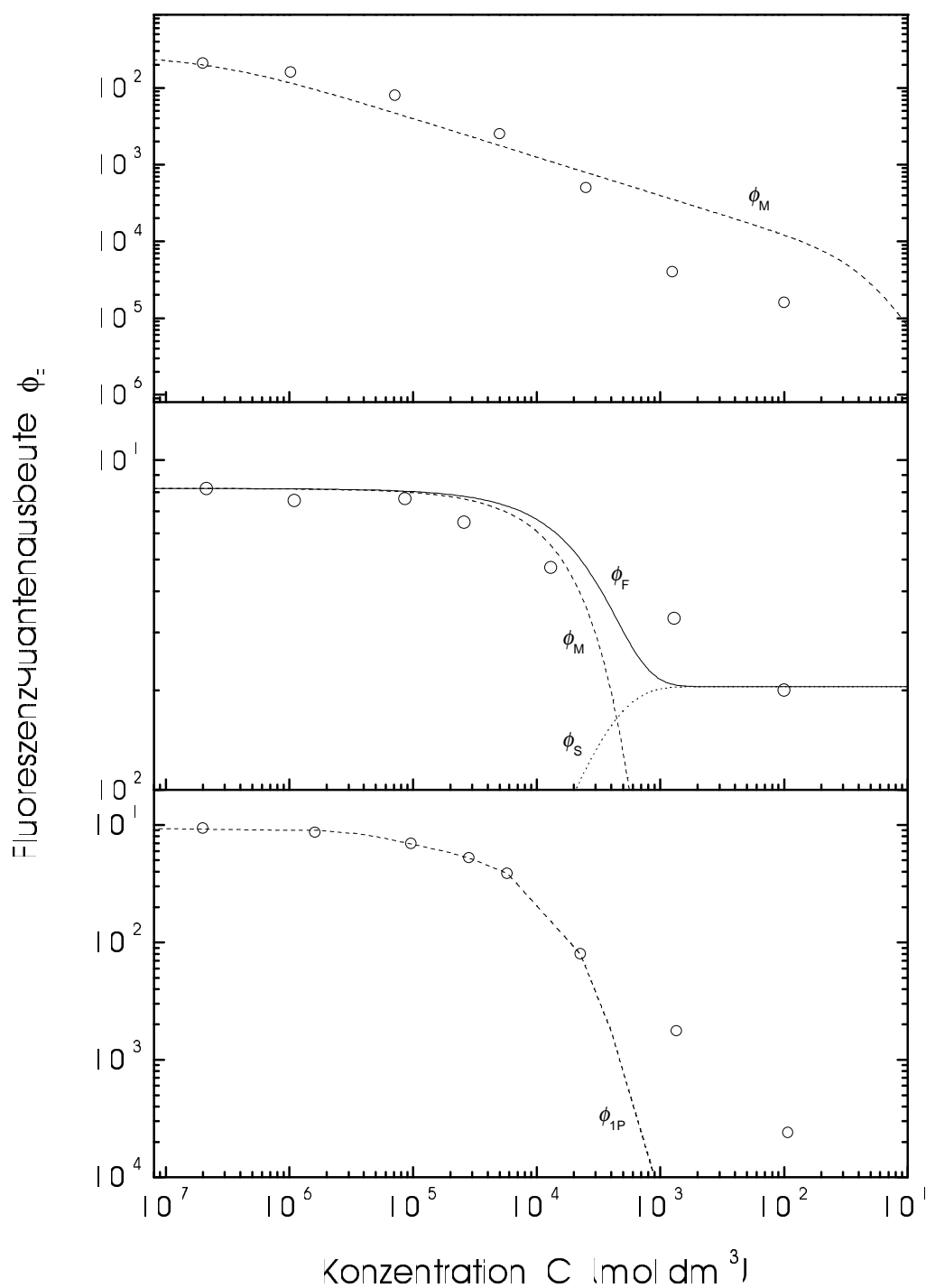


Abbildung 2.15: Fluoreszenzquantenausbeute ϕ_F in Abhängigkeit von der Farbstoffkonzentration für ICG-NaI in Wasser (oben), Ethanol (mitte) und Blutplasma (unten). Die eingezeichneten Kurven entsprechen den Gl. (2.35)–(2.37).

In Wasser bildet ICG-NaI physikalisch gebundene Dimere und Oligomere im Grundzustand. Die Bildung von Dimeren kann beschrieben werden durch



wobei M das Monomer, D das Dimer und k_{MD} bzw. k_{DM} die Ratenkonstanten sind. Die zeitliche Neubildung von Dimeren wird beschrieben durch

$$\frac{d[\text{D}]}{dt} = k_{\text{MD}}[\text{M}]^2 - k_{\text{DM}}[\text{D}]. \quad (2.12)$$

Dabei ist $[\text{D}]$ die Dimer-Konzentration und $[\text{M}]$ die Monomer-Konzentration. Unter Gleichgewichtsbedingungen $d[\text{D}]/dt = 0$ kann die Dimer-Konzentration geschrieben werden als

$$[\text{D}] = \frac{k_{\text{MD}}}{k_{\text{DM}}} [\text{M}]^2 = K_{\text{D}} [\text{M}]^2 \quad (2.13)$$

wobei K_{D} die Dimerisierungskonstante ist.

Ausgedrückt in Mol-Anteilen, $\chi_{\text{D}} = 2[\text{D}]/(2[\text{D}] + [\text{M}]) = 2[\text{D}]/C$ und $\chi_{\text{M}} = 1 - \chi_{\text{D}}$ (χ_{D} ist der Mol-Anteil an Dimeren, χ_{M} der Mol-Anteil an Monomeren) kann Gl. (2.13) aufgelöst werden zu

$$\chi_{\text{M}} = 1 + \frac{1}{4CK_{\text{D}}} - \left[\left(1 + \frac{1}{4CK_{\text{D}}} \right)^2 - 1 \right]^{1/2}. \quad (2.14)$$

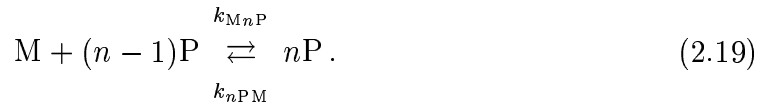
Die Dimerisierungskonstante K_{D} kann durch Auswerten der konzentrationsabhängigen Absorptionsspektren von ICG-NaI in Wasser abgeschätzt werden (siehe unten).

In Ethanol ist die Affinität von ICG-NaI zum Lösungsmittel sehr hoch, wodurch die Wahrscheinlichkeit zur Dimerbildung deutlich reduziert wird. Bei hohen Konzentrationen wird der Abstand der Farbstoffmoleküle klein und statisch bedingt treten miteinander-wechselwirkende, eng benachbarte Molekülpaare und größere Aggregate auf. Die Absorption und Emission des Farbstoffes wird beeinflusst, wenn die Moleküle sich statistisch nahe kommen innerhalb eines Wechselwirkungsvolumens V_{I} [For51, LP86]. Der Mol-Anteil χ_{S} an Molekülen, die sich bei einer Konzentration C innerhalb des Wechselwirkungsvolumens V_{I} aufhalten, ist gegeben durch [For51]

$$\chi_I = 1 - \exp(-V_I N_A C) \quad (2.15)$$

wobei N_A die Avogadro-Konstante ist. Auch V_I kann durch Auswertung des Absorptionsspektrums abgeschätzt werden (siehe unten).

In Blutplasma liegen die Farbstoffmoleküle vor als Monomere in wässriger Umgebung (Konzentration $[M] = \chi_M C$), Dimere in wässriger Umgebung (Konzentration $[D] = \chi_D C/2$), an Proteine gebundene Monomere (Konzentration $[1P] = \chi_{1P} C$), zwei Farbstoffmoleküle, die an ein Protein gebunden sind (Konzentration $[2P] = (\chi_{2P}/2)C$) u. s. w. (Konzentration eines n -mers $[nP] = (\chi_{nP}/n)C$). Die Aggregationsprozesse werden beschrieben durch



Nach Aufstellen des zugehörigen Raten-Gleichungssystems [PPB96] erhält man für die jeweiligen Konzentrationen folgende Beziehungen:

$$[M] + 2[D] + \sum_{i=1}^n i[iP] = (\chi_M + \chi_D + \sum_{i=1}^n \chi_{iP})C = C \quad (2.20)$$

$$[P] + \sum_{i=1}^n [iP] = \chi_P + C_P + C \sum_{i=1}^n \frac{\chi_{iP}}{i} = C_P \quad (2.21)$$

Dabei ist C die gesamte Farbstoffkonzentration und C_P die gesamte Proteinkonzentration. Für die Dimerisierungskonstante K_D und die Affinitätskonstanten K_{iP} der Farbstoffmoleküle gegenüber Proteinen gilt

$$[D] = K_D [M]^2 \quad (2.22)$$

$$[1P] = K_{1P} [M][P] \quad (2.23)$$

$$[iP] = K_{iP} [M][(i-1)P] \quad (2.24)$$

mit $K_{iP} = k_{MiP}/k_{iPM}$ für $i = 2 \dots n$. Durch Lösen der Gl. (2.20)–(2.24) erhält man die Gleichgewichtskonzentrationen $[M]$, $[D]$, $[P]$, $[1P]$, \dots , $[nP]$ als Funktion der Gleichgewichtskonstanten K_D , K_{1P} , \dots , K_{iP} und der Gesamtkonzentrationen C und C_P .

d) Absorptionsverhalten

Das Absorptionsverhalten von ICG-NaI in Wasser (Abb. 2.9 (oben)) wird bis zu $C \approx 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$ bestimmt durch die Bildung von Dimeren. Das Absorptionsspektrum setzt sich deshalb zusammen aus dem Absorptionsquerschnitt für Monomere (σ_M) und dem Absorptionsquerschnitt für Dimere (σ_D) gemäß

$$\begin{aligned} \sigma(\lambda, C) &= \chi_M(C) \sigma_M(\lambda) + \chi_D(C) \sigma_D(\lambda) \\ &= [1 - \chi_D(C)] \sigma_M(\lambda) + \chi_D(C) \sigma_D(\lambda) \end{aligned} \quad (2.25)$$

wobei χ_D durch Gl. (2.14) gegeben ist. Bei niedrigen Konzentrationen ($C < 10^{-7} \text{ mol dm}^{-3}$) wird χ_D klein und der gemessene Absorptionsquerschnitt $\sigma(\lambda)$ entspricht $\sigma_M(\lambda)$. An den beiden isosbestischen Punkten ($\lambda = 738 \text{ nm}$ und $\lambda = 832 \text{ nm}$) gilt $\sigma_M(\lambda) = \sigma_D(\lambda) = \sigma(\lambda)$ unabhängig von der Konzentration. Bei $\lambda_{\max} = 778 \text{ nm}$, wo $\sigma_M(\lambda)$ sein Maximum erreicht, ändert sich $\sigma(\lambda)$ sehr stark mit der Konzentration. Die Konzentrationsabhängigkeit von $\sigma(\lambda_{\max})$ kann zur Abschätzung der Dimerisierungskonstante K_D sowie von $\chi_M(\lambda_{\max})$ und $\chi_D(\lambda_{\max})$ durch nicht-lineare Regression der experimentellen Daten benutzt werden [NM65]. Das Ergebnis dieser Anpassung ist in Abb. 2.16 (oben) dargestellt ($K_D = 3,6 \times 10^5 \text{ dm}^3 \text{ mol}^{-1}$, $\sigma_D(778 \text{ nm}) = 2 \times 10^{-16} \text{ cm}^2$ und $\sigma_M(778 \text{ nm}) = 1,1 \times 10^{-15} \text{ cm}^2$).

Den Monomer- und Dimer-Absorptionsquerschnitt erhält man aus zwei Absorptionsspektren $\sigma(\lambda, C_1)$ und $\sigma(\lambda, C_2)$, wenn man Gl. (2.25) nach $\sigma_M(\lambda)$ bzw. $\sigma_D(\lambda)$ auflöst:

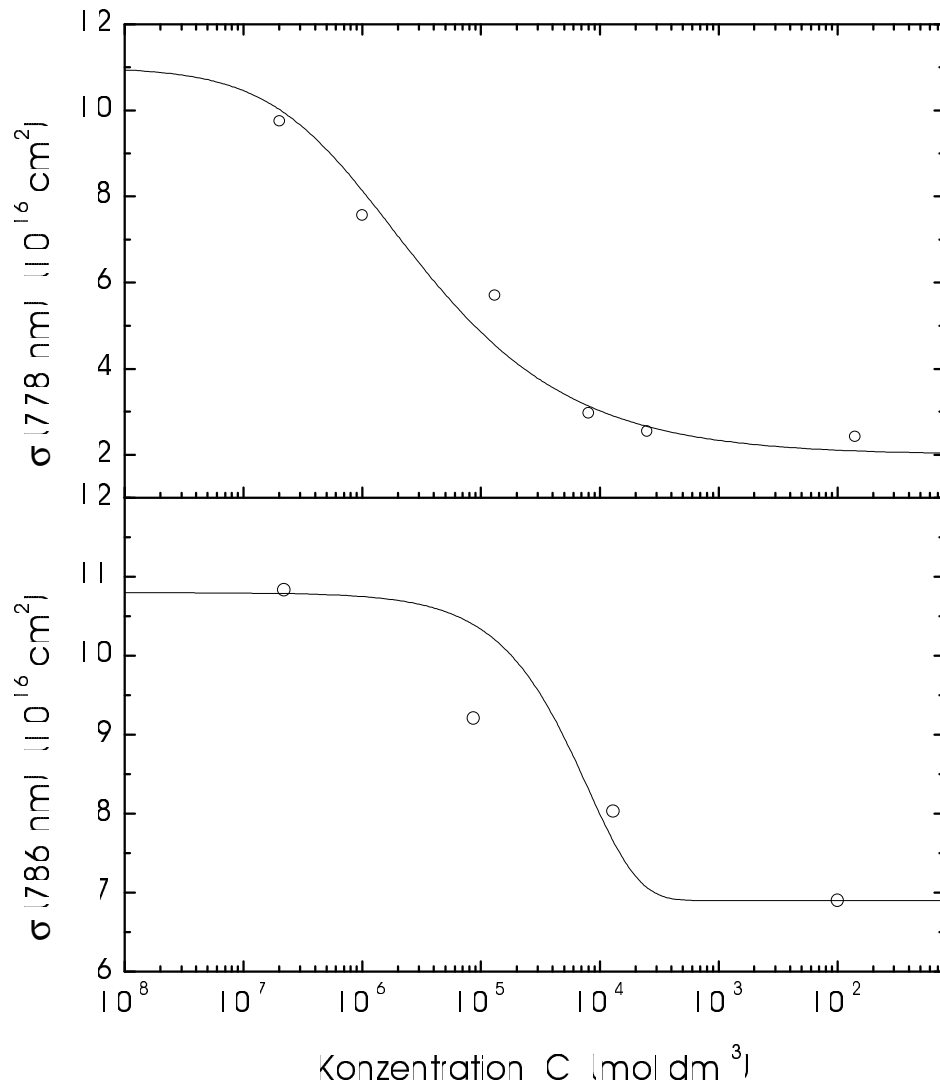


Abbildung 2.16: Oben Absorptionsquerschnitt $\sigma(\lambda_{\max}) = \sigma(778 \text{ nm})$ von ICG-NaI in Wasser vs. Konzentration (Daten aus Abb. 2.9 (oben)). Die eingezeichnete Kurve ist die nicht-lineare Regression [NM65] der Gl. (2.25) und (2.14) an die experimentellen Daten (physically bound ground state dimer fit). Die Parameter des Fits sind $K_D = 3,6 \times 10^5 \text{ dm}^3 \text{ mol}^{-1}$, $\sigma_D(778 \text{ nm}) = 2 \times 10^{-16} \text{ cm}^2$ und $\sigma_M(778 \text{ nm}) = 1,1 \times 10^{-15} \text{ cm}^2$ ($R^2 = 0,9686$). Unten Absorptionsquerschnitt $\sigma(\lambda_{\max}) = \sigma(786 \text{ nm})$ von ICG-NaI in Ethanol vs. Konzentration (Daten aus Abb. 2.10 (oben)). Die eingezeichnete Kurve ist die nicht-lineare Regression [NM65] der Gl. (2.28) und (2.15) an die experimentellen Daten (closely spaced pair fit). Die Parameter des Fits sind $V_1 = 7,6 \times 10^3 \text{ nm}^3$ und $\sigma_S(786 \text{ nm}) = 4,3 \times 10^{-16} \text{ cm}^2$ ($R^2 = 0,8744$).

$$\sigma_M(\lambda) = \frac{\chi_D(C_2) \sigma(\lambda, C_1) - \chi_D(C_1) \sigma(\lambda, C_2)}{\chi_D(C_2) - \chi_D(C_1)} \quad (2.26)$$

$$\sigma_D(\lambda) = \frac{[1 - \chi_D(C_1)] \sigma(\lambda, C_2) - [1 - \chi_D(C_2)] \sigma(\lambda, C_1)}{\chi_D(C_2) - \chi_D(C_1)} \quad (2.27)$$

Für die Berechnung der Monomer- und Dimer-Absorptionsquerschnitte in Abb. 2.9 (unten) wurden die Konzentrationen $C_1 = 2 \times 10^{-7} \text{ mol dm}^{-3}$ (1) und $C_2 = 8 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ (4) aus Abb. 2.9 (oben) verwendet.

Das Absorptionsverhalten von ICG-NaI in Ethanol (Abb. 2.10 (oben)) wird dominiert durch die Wechselwirkungen von eng aneinanderliegenden Molekülen bis zu Konzentrationen von $C \approx 10^{-2} \text{ mol dm}^{-3}$. Das Absorptionsspektrum setzt sich aus dem Absorptionsquerschnitt für Monomere (σ_M) und eng benachbarte Paare (σ_S) zusammen gemäß

$$\begin{aligned} \sigma(\lambda, C) &= \chi_M(C) \sigma_M(\lambda) + \chi_S(C) \sigma_S(\lambda) \\ &= [1 - \chi_S(C)] \sigma_M(\lambda) + \chi_S(C) \sigma_S(\lambda) \end{aligned} \quad (2.28)$$

wobei χ_S durch Gl. (2.15) festgelegt ist. Insgesamt werden für Ethanol nur geringe konzentrationsabhängige Unterschiede in den Spektren festgestellt. Das Spektrum für die kleinste Konzentration ($C = 2,2 \times 10^{-7} \text{ mol dm}^{-3}$) gibt sehr gut den Absorptionsquerschnitt für Monomere wieder. Ab $C \approx 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ nimmt die Absorption an der Wellenlänge des Absorptionsmaximums des Monomers $\lambda_{\max} = 786 \text{ nm}$ ab, da jetzt die Wechselwirkungen der Farbstoffmoleküle auf ihre nächsten Nachbarn spürbar werden (Abb. 2.16 (unten)). Die eingezeichnete Ausgleichskurve ist die nicht-lineare Regression der Gl. (2.28) und (2.15) an die experimentellen Daten. Die Parameter des Fits sind $V_I = 7,6 \times 10^3 \text{ nm}^3$ (Durchmesser der Wechselwirkungszone $d_I = 24,4 \text{ nm}$), $\sigma_S(786 \text{ nm}) = 4,3 \times 10^{-16} \text{ cm}^2$ und $\sigma_M(786 \text{ nm}) = 1,1 \times 10^{-15} \text{ cm}^2$.

Der Absorptionsquerschnitt für die miteinander wechselwirkenden Moleküle wurde abgeleitet von $\sigma_M(\lambda) \approx \sigma(\lambda, C = 2,2 \times 10^{-7} \text{ mol dm}^{-3})$ und $\sigma(\lambda, C = 1 \times 10^{-2} \text{ mol dm}^{-3})$ durch Auflösen von Gl. (2.28) nach $\sigma_S(\lambda)$. Die resultierenden Absorptionsquerschnitte für eng benachbarte Paare und Monomere zeigt Abb. 2.10 (unten).

Das Absorptionsverhalten von ICG-NaI in Blutplasma (Abb. 2.11) wird beeinflusst durch die Bindung von Farbstoffmolekülen an Proteine. Der gemessene Absorptionsquerschnitt kann beschrieben werden durch

$$\sigma(\lambda, C) = \chi_M \sigma_M(\lambda) + \chi_D \sigma_D(\lambda) + \sum_{i=1}^n \chi_{iP} \sigma_{iP}(\lambda) \quad (2.29)$$

wobei $\sigma_{iP}(\lambda)$ der Absorptionsquerschnitt eines Moleküls ist, wenn i Moleküle an das Protein gebunden sind.

Bei niedrigen Farbstoffkonzentrationen ($C \lesssim 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$) ist das Absorptionsspektrum unabhängig von der Konzentration. Die Farbstoffmoleküle sind dann überwiegend an Proteine gebunden (χ_{iP} nahezu Eins). Das gleiche Verhalten ist auch für ICG-NaI in wässriger Albuminlösung zu beobachten, solange die Teilchenzahldichte des Farbstoffes höchstens so groß ist wie die von Albumin [PPB96]. Kurve (1) in Abb. 2.11 ($C = 1,6 \times 10^{-7} \text{ mol dm}^{-3}$) ist deshalb eine gute Näherung für $\sigma_{1P}(\lambda)$. Das Absorptionsmaximum von $\sigma_{1P}(\lambda)$ ist im Vergleich zur Monomer-Absorption $\sigma_M(\lambda)$ in Wasser um etwa 25 nm rot-verschoben.

Bis zu $C \approx 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$ ist keine Absorptionsbande bei $\lambda_D = 695 \text{ nm}$ (Dimer-Absorption) zu beobachten, was darauf hindeutet, dass die Bildung von Dimeren bis zu dieser Konzentration sehr gering ist. Deshalb kann auch angenommen werden, dass der Affinitätskoeffizient K_{1P} vergleichbar mit oder größer als die Dimerisierungskonstante K_D ist (Fig. 10 in [PPB96]). Die spektralen Unterschiede für Konzentrationen im Bereich 10^{-5} – $2 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$ sind vermutlich auf Mehrfach-Adsorption von Farbstoffmolekülen an Proteine zurückzuführen. Die Spektren bei hohen Konzentrationen ($C = 1,1 \times 10^{-2} \text{ mol dm}^{-3}$) ähneln denen von höheren Oligomeren, die in Wasser beobachtet wurden (Abb. 2.9), und haben vermutlich den selben Ursprung.

e) Emissionsverhalten

Aus den Fluoreszenzquantenverteilungen $E(\lambda)$ und Fluoreszenzquantenausbeuten ϕ_F von ICG-NaI in Wasser, Ethanol und Blutplasma (Abb. 2.12–2.15) können die natürlichen Strahlungslebensdauern τ_{rad} unter Benutzung der *Strickler-Berg-Formel* [SB62, BD63] ermittelt werden:

$$\frac{1}{\tau_{\text{rad}}} = 8\pi c_0 \frac{\int_{\text{em}} E(\lambda) d\lambda}{\int_{\text{em}} E(\lambda) \lambda^3 n^{-3}(\lambda) d\lambda} \int_{\text{abs}} \frac{\sigma_{\text{abs}}(\lambda)}{\lambda n(\lambda)} d\lambda \quad (2.30)$$

Dabei ist c_0 die Lichtgeschwindigkeit im Vakuum, $n(\lambda)$ der Brechungsindex der Lösung bei der Wellenlänge λ und $\sigma_{\text{abs}}(\lambda)$ der Absorptionsquerschnitt des Farbstoffes. Die Integrale erstrecken sich über die $S_1 \rightarrow S_0$ Fluoreszenzbande (em) und die $S_0 \rightarrow S_1$

Absorptionsbande (abs). τ_{rad} erwies sich als nahezu unabhängig von der Konzentration. Die für Monomere errechneten Werte sind $\tau_{\text{rad}} = 4,0 \pm 0,5 \text{ ns}$ (ICG-NaI in Wasser), $4,5 \pm 0,7 \text{ ns}$ (ICG-NaI in Ethanol) und $4,1 \pm 0,2 \text{ ns}$ (ICG-NaI in Blutplasma).

Die Fluoreszenzlebensdauern τ_{F} können mithilfe der Beziehung

$$\tau_{\text{F}} = \phi_{\text{F}} \tau_{\text{rad}} \quad (2.31)$$

berechnet werden und sind in Abb. 2.17 in Abhängigkeit von der Konzentration dargestellt.

Dimere, Oligomere, wechselwirkende Molekülpaare und Mehrfach-Adsorption von Molekülen an kleine Partikel fungieren als Fluoreszenzquenching-Zentren. Die Fluoreszenzleistung von Quenchingzentren ist im allgemeinen schwach [For51, LP86]. Die Monomer-Fluoreszenz nimmt bei Anwesenheit von Quenchingzentren aufgrund des Energietransfers von angeregten Molekülzuständen auf Quenching-Moleküle ab [For51].

Elektrische Dipol-Energietransfer-Raten (Förster-Typ) zwischen angeregten und nicht-angeregten Monomer-Molekülen sind gegeben durch

$$k_{\text{ET}} = k_{\text{F}}(0) \left(\frac{C}{C_0} \right)^2 = \frac{1}{\tau_{\text{F}}(0)} \left(\frac{C}{C_0} \right)^2 \quad (2.32)$$

wobei $\tau_{\text{F}}(0) = 1/k_{\text{F}}(0)$ die Fluoreszenzlebensdauer bei niedrigen Konzentrationen und C_0 die kritische Konzentration bzgl. des Energietransfers ist. Bei $C = C_0$ beträgt die Energietransfer-Rate $k_{\text{ET}} = 1/\tau_{\text{F}}(0)$. C_0 ist verbunden mit einer kritischen Distanz für Energietransfer (*Förster-Radius*) R_0 durch $C_0 = (0,74 N_{\text{A}} R_0^3)^{-1}$. Der Förster-Radius kann berechnet werden durch [For51, Fle85, For86]

$$R_0^6 = \frac{3}{64\pi^5} \int_{\text{em}} E(\lambda) \sigma_{\text{abs}}(\lambda) \lambda^4 n^{-4}(\lambda) d\lambda. \quad (2.33)$$

Die Werte für R_0 und C_0 von ICG-NaI in Wasser, Ethanol und Blutplasma wurden aus den Monomer-Fluoreszenzquantenverteilungen $E_{\text{M}}(\lambda)$ und Absorptionsquerschnitten $\sigma_{\text{M}}(\lambda)$ berechnet: $R_0 = 4,7 \text{ nm}$ und $C_0 = 2 \times 10^{-2} \text{ mol dm}^{-3}$ für ICG-NaI in Wasser, $R_0 = 6,2 \text{ nm}$ und $C_0 = 9 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$ für ICG-NaI in Ethanol und $R_0 = 6,6 \text{ nm}$ und $C_0 = 8 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$ für ICG-NaI in Blutplasma.

Die Rate k_{EQ} für den Energietransfer von angeregten Monomeren auf Quenchingzentren ist gegeben durch [For51, LP86]

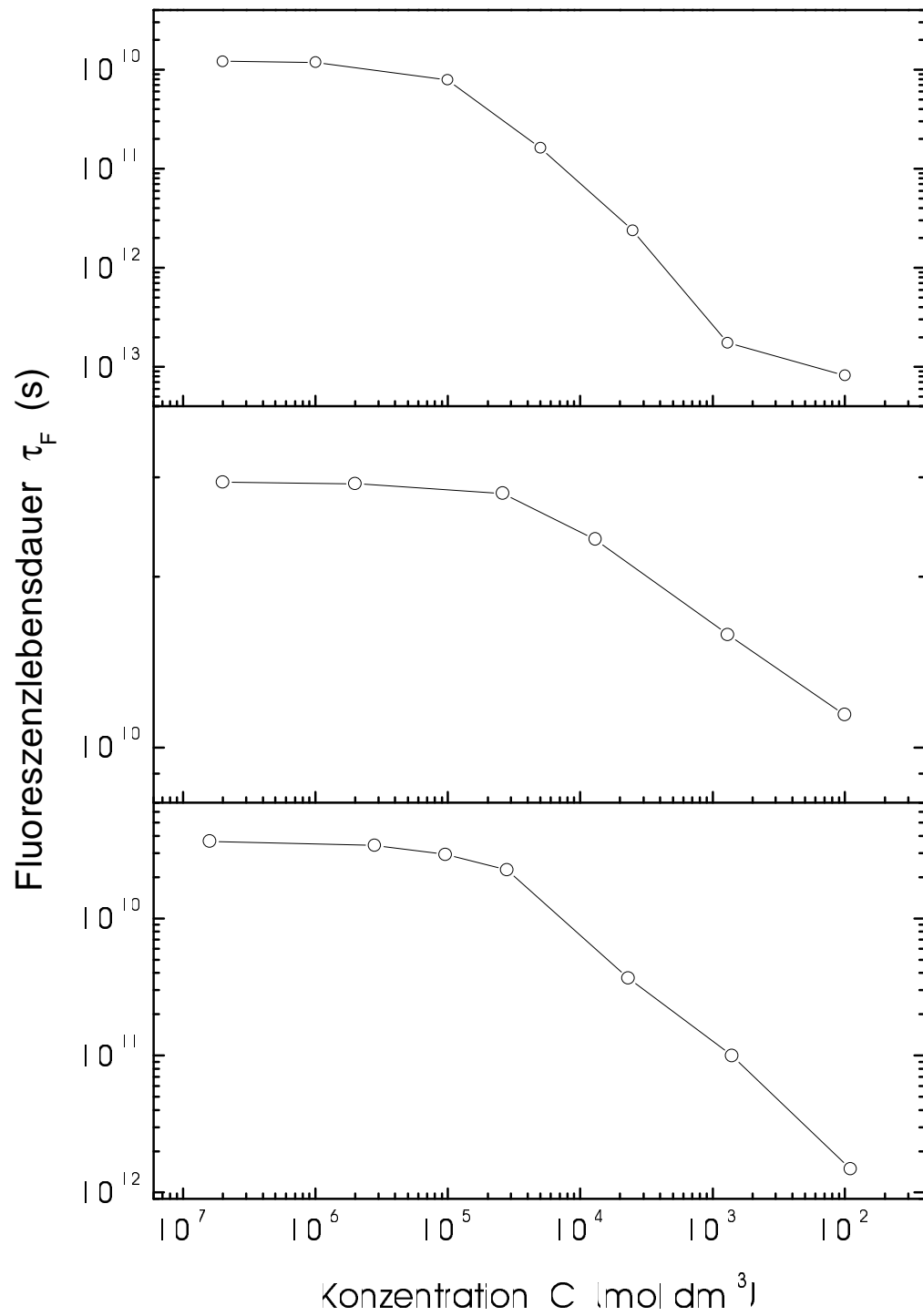


Abbildung 2.17: Abhängigkeit der Fluoreszenzlebensdauer τ_F von der Farbstoffkonzentration für ICG-NaI in Wasser (oben), ICG-NaI in Ethanol (mitte) und ICG-NaI in Blutplasma (unten).

$$k_{\text{EQ}} = k_{\text{ET}} \chi_{\text{Q}} = \frac{1}{\tau_{\text{F}}(0)} \left(\frac{C}{C_0} \right)^2 \chi_{\text{Q}} \quad (2.34)$$

wobei χ_{Q} für χ_{D} , χ_{S} oder $\sum_{i=1}^n \chi_{i\text{P}}$ steht.

Die Fluoreszenzquantenausbeute $\phi_{\text{F}}(C)$ setzt sich zusammen aus Monomeren ($\phi_{\text{M}}(C)$) und Quenchingzentren ($\phi_{\text{Q}}(C)$) gemäß

$$\phi_{\text{F}}(C) = \phi_{\text{M}}(C) + \phi_{\text{Q}}(C). \quad (2.35)$$

Vernachlässigt man den Energie-Rücktransfer von Quenchingzentren an die Monomere und betrachtet man nur eine Sorte von Quenchingzentren, können die Beiträge der Monomere $\phi_{\text{M}}(C)$ und Quenchingzentren $\phi_{\text{Q}}(C)$ geschrieben werden als [WP93]

$$\phi_{\text{M}}(C) = \chi'_{\text{M}} \frac{\phi_{\text{M},0}}{1 + \chi_{\text{Q}} g (C/C_0)^2} \quad (2.36)$$

$$\begin{aligned} \phi_{\text{Q}}(C) &= \phi_{\text{Q},\text{M}} + \phi_{\text{Q},\text{Q}} \\ &= \chi'_{\text{M}} \frac{\phi_{\text{Q}} g (C/C_0)^2}{1 + \chi_{\text{Q}} g (C/C_0)^2} \phi_{\text{Q},0} + \chi'_{\text{Q}} \phi_{\text{Q},0} \end{aligned} \quad (2.37)$$

mit

$$\chi'_{\text{M}} = \frac{\chi_{\text{M}} \sigma_{\text{M}}(\lambda_{\text{ex}})}{\chi_{\text{M}} \sigma_{\text{M}}(\lambda_{\text{ex}}) + \chi_{\text{Q}} \sigma_{\text{Q}}(\lambda_{\text{ex}})} \quad (2.38)$$

und

$$\chi'_{\text{Q}} = \frac{\chi_{\text{Q}} \sigma_{\text{Q}}(\lambda_{\text{ex}})}{\chi_{\text{M}} \sigma_{\text{M}}(\lambda_{\text{ex}}) + \chi_{\text{Q}} \sigma_{\text{Q}}(\lambda_{\text{ex}})} \quad (2.39)$$

λ_{ex} ist die Anregungswellenlänge (hier $\lambda_{\text{ex}} = 682 \text{ nm}$). $\phi_{\text{M},0} = \phi_{\text{F}}(C = 0)$ ist die reine Monomer-Quantenausbeute bei Abwesenheit von Quenchingzentren. $\phi_{\text{Q},0}$ ist der Beitrag von Quenchingzentren, der durch angeregte Monomere entsteht und $\phi_{\text{Q},\text{Q}}$ der Beitrag zur Quantenausbeute von Quenchingzentren, der durch angeregte Quenchingzentren verursacht wird. g ist das Verhältnis aus der Wahrscheinlichkeit für einen Monomer-Quenchingzentren-Energietransfer zur Wahrscheinlichkeit für einen Energietransfer von Monomer zu Monomer (bei den Berechnungen hier wird $g = 1$ angenommen).

Das System ICG-NaI in Wasser ist geprägt durch das Auftreten von Monomeren, Dimeren und Oligomeren. Die gestrichelte Linie in Abb. 2.15 (oben) zeigt die erwartete Monomer-Fluoreszenz (Gl. (2.36)). Die Parameter des Fits sind $\phi_{M,0} = 0,026$, $K_D = 3,6 \times 10^5 \text{ dm}^3 \text{ mol}^{-1}$ (s. Abb. 2.16) und $C_0 = 2 \times 10^{-2} \text{ mol dm}^{-3}$ (Gl. (2.33)). Bis zu $C \approx 2 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$ passt die errechnete Kurve gut zu den experimentellen Daten. Bei höheren Konzentrationen ist die gesamte Fluoreszenzquantenausbeute ϕ_F kleiner als die errechnete Quantenausbeute für Monomere und das Emissionsverhalten kann nicht mehr durch ein einfaches Monomer-Dimer-Gleichgewicht beschrieben werden.

Das System ICG-NaI in Ethanol kann bis zu $C \approx 1 \times 10^{-2} \text{ mol dm}^{-3}$ charakterisiert werden durch Monomere und miteinander-wechselwirkende Molekülpaare. Die durchgezogene Linie in Abb. 2.15 (mitte) zeigt die Anpassung von Gl. (2.35) an die experimentellen Daten mit den Parametern $\phi_{M,0} = 0,082$, $V_I = 7,6 \times 10^3 \text{ nm}^3$ (Abb. 2.16), $C_0 = 9 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$ (Gl. (2.33)) und $\phi_{Q,0} = \phi_{S,0} = 2,1 \times 10^{-2}$. Außerdem zeigen in Abb. 2.15 (mitte) die gestrichelte Linie $\phi_M(C)$ und die gepunktete Linie $\phi_S(C)$. Bis zu $C \approx 2 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$ dominiert die Monomer-Fluoreszenz, während für $C = 1 \times 10^{-2} \text{ mol dm}^{-3}$ die Fluoreszenz durch wechselwirkende Molekülpaare überwiegt.

Für ICG-NaI in Blutplasma wird die Fluoreszenz bis zu $C \approx 2 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$ weitgehend durch die Emission einzelner Moleküle, die an Proteine gebunden sind, bestimmt. Die gestrichelte Linie in Abb. 2.15 (unten) zeigt $\chi_{1A}(C)\phi_{1A,0}$, was im betrachteten Konzentrationsbereich identisch mit $\phi_{1A}(C)$ ist ($C \ll C_0 = 8 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$). Ab $C \approx 2 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$ scheint die Fluoreszenz durch 2- und 3-fach Adsorption von Farbstoffmolekülen an Proteine und Oligomere ähnlich wie in wässriger Umgebung dominiert zu sein.

Sind Fluoreszenzquantenverteilung $E(\lambda)$ und Strahlungslebensdauer τ_{rad} (Gl. (2.30)) bekannt, kann der Wirkungsquerschnitt für stimulierte Emission σ_{em} über die Beziehung [PL87]

$$\sigma_{\text{em}}(\lambda) = \frac{\lambda^4 E(\lambda)}{8\pi n^2(\lambda) c_0 \tau_{\text{rad}} \phi_F} = \frac{\lambda^4}{8\pi n^2(\lambda) c_0 \tau_{\text{rad}}} \frac{E(\lambda)}{\int_{\text{em}} E(\lambda') d\lambda'} \quad (2.40)$$

errechnet werden. Die ermittelten Wirkungsquerschnitte für stimulierte Emission von Monomeren in Wasser und Ethanol sowie einzeln gebundenen ICG-Molekülen in Blutplasma sind zusammen mit den jeweiligen Absorptionsquerschnitten in Abb. 2.18 dargestellt.

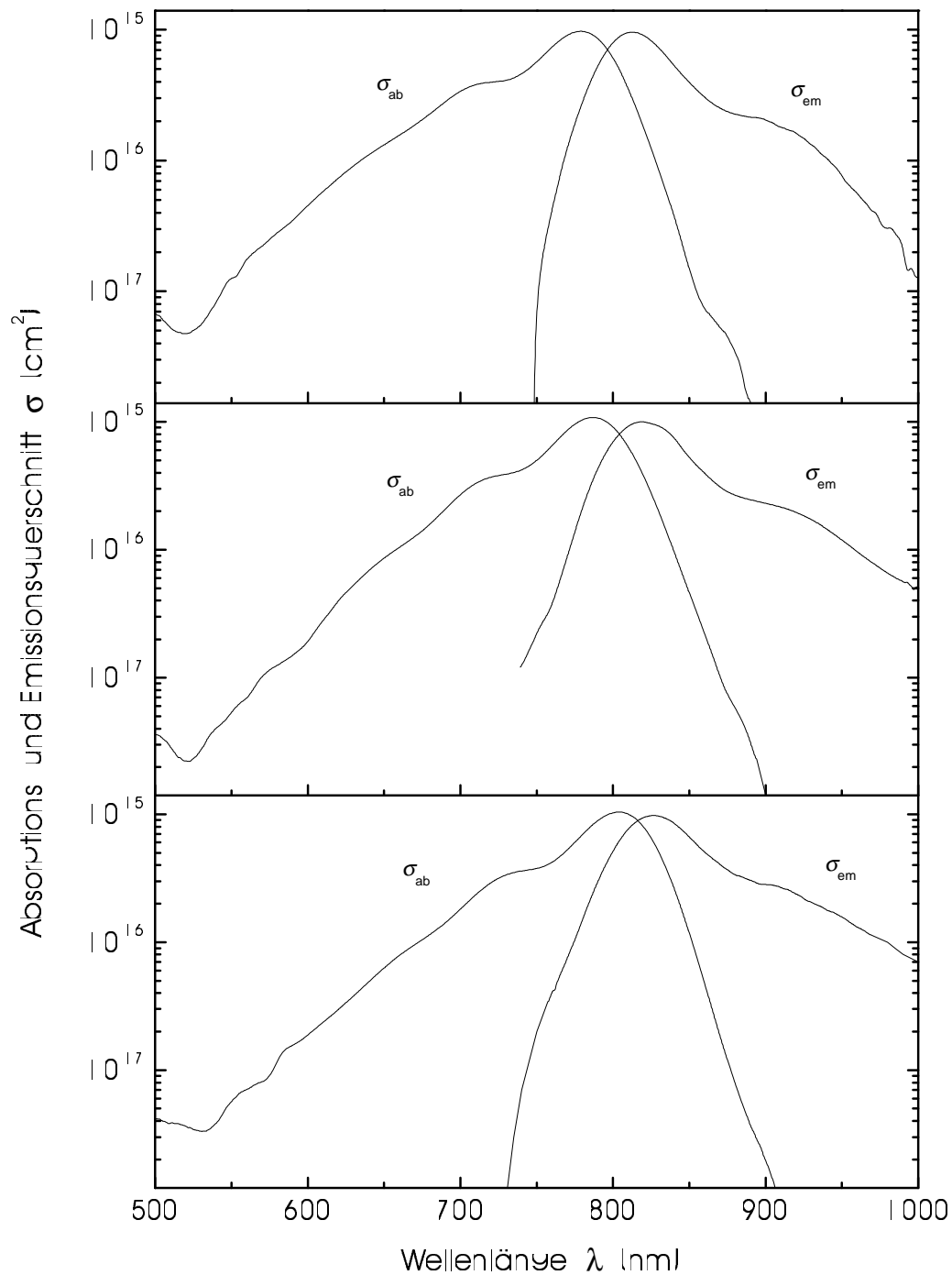


Abbildung 2.18: Absorptions- (σ_{abs}) und stimulierte Emissions-Wirkungsquerschnitte (σ_{em}) von ICG-NaI-Monomeren in Wasser (oben), ICG-NaI-Monomeren in Ethanol (mitte) und von einzelnen, an Plasmaproteine gebundenen ICG-NaI-Molekülen (unten).

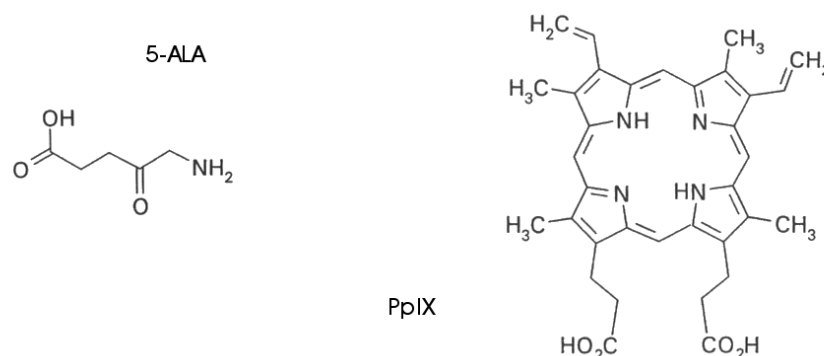


Abbildung 2.19: Strukturformeln von 5-Aminolävulinsäure (5-ALA, Molekulargewicht 160 g/mol) und Protoporphyrin IX (PpIX, Molekulargewicht 562,7 g/mol).

2.5 Protoporphyrin IX

Bereits seit längerer Zeit werden Porphyrine, die nach Gabe von 5-Aminolävulinsäure (5-ALA) in der Hämbiosynthese entstehen in der FD eingesetzt und auf ihre Effizienz in der Behandlung von oberflächlichen Läsionen hin untersucht [SCK96]. Hauptkomponente der 5-ALA-induzierten Porphyrine ist Protoporphyrin IX (PpIX) [KP92, FAG97, FLS99]. Die Strukturformeln von 5-ALA und PpIX zeigt Abb. 2.19.

2.5.1 Porphyrine

Porphyryne sind zyklische Tetra-Pyrrole, bei denen die Pyrrolringe über Methinbrücken verbunden sind. Die gebildeten Ringmoleküle sind aromatische Systeme und sehr stabil. Porphyrine unterscheiden sich durch ihre verschiedenartigen Seitenketten, wobei die Nomenklatur trotz Vereinheitlichung durch die IUPAC⁸ und IUB⁹ meist nach der ursprünglichen Systematik von *Fischer* erfolgt (Abb. 2.20). Für viele Porphyrine werden zudem Trivialnamen verwendet (Tab. 2.5).

2.5.2 Löslichkeit

Die Löslichkeit von Porphyrinen in Wasser nimmt mit sinkender Zahl an Carboxylgruppen ab. Von den in der Hämbiosynthese gebildeten Porphyrinen z.B. ist Uro-

⁸International Union of Pure and Applied Chemistry

⁹International Union of Biochemistry

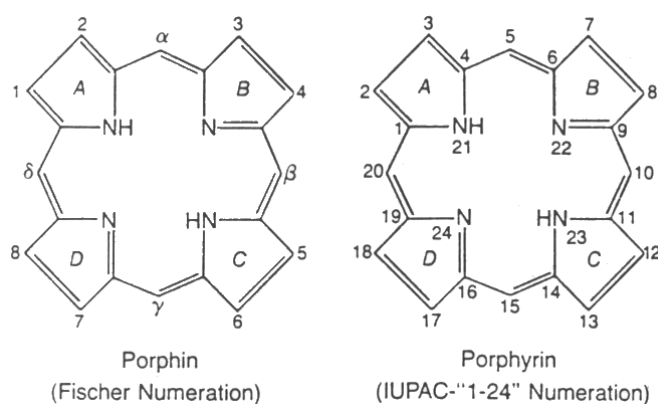


Abbildung 2.20: Nomenklatur von Porphyrinen [KSG89]. **Links** Numerierung nach Fischer mit „Porphin“ als Grundstruktur; **Rechts** Numerierung nach IUPAC („1–24“-Numerierung) mit „Porphyrin“ als Grundstruktur.

Name	Substituent [†]							
IUPAC-Numerierung	2	3	7	8	12	13	17	18
Fischer-Numerierung	1	2	3	4	5	6	7	8
Uroporphyrin	A	P	A	P	A	P	A	P
Heptacarboxyporphyrin	M	P	A	P	A	P	A	P
Hexacarboxyporphyrin	M	P	M	P	A	P	A	P
Pentacarboxyporphyrin	M	P	M	P	A	P	M	P
Coproporphyrin	M	P	M	P	M	P	M	P
Protoporphyrin IX	M	V	M	V	M	P	P	M
Hämatoporphyrin IX	M	HÄ	M	HÄ	M	P	P	M

[†] M = CH₃ (Methyl); A = CH₂COOH (Acetat); P = CH₂CH₂COOH (Propionat);
V = CH=CH₂ (Vinyl); HÄ = CHOCH₃ (Häm)

Tabelle 2.5: Struktur und Trivialnamen von Porphyrinen [KSG89].

porphyrin (mit 8 Carboxylgruppen) am besten wasserlöslich und Protoporphyrin (mit 2 Carboxylgruppen) am schlechtesten.¹⁰

2.5.3 Spektrale Eigenschaften

Die spektralen Eigenschaften von Porphyrinen werden durch das über die Ringatome verteilte π -Elektronensystem bestimmt [Gou78]. Alle Porphyrine zeigen im Absorptionsspektrum eine starke Bande um 400 nm (*Soret-Bande*) und vier weitere, etwa um den Faktor 10–20 mal schwächere Banden (*Q-Banden*) zwischen 500 nm und 630 nm, die mit zunehmender Wellenlänge abnehmen. Die genaue Lage, Form und Intensität der Absorptionsbanden hängt vom Lösungsmittel, der Konzentration des Porphyrins und natürlich vom Porphyrin selbst (Art und Zahl der Seitengruppen) ab. Tab. 2.6 zeigt hierzu die Lage der Absorptionsmaxima und -minima für PpIX in verschiedenen Lösungsmitteln.

Im Emissionsspektrum von metallfreien Porphyrinen ist ein deutliches Maximum um 630 nm und ein, im Vergleich dazu wesentlich schwächeres Maximum um 700 nm zu beobachten. Bei Metall-Porphyrinen tritt dagegen nur eine sehr schwache Fluoreszenz auf. Grund hierfür ist eine höhere Übergangswahrscheinlichkeit für strahlungslose Übergänge bei Vorhandensein von schweren Metallionen [CVJ78].

In eigenen Untersuchungen wurde das Absorptions- und Emissionsverhalten von Protoporphyrin IX (PpIX) in Dimethylsulfoxid (DMSO) in Abhängigkeit von der Konzentration untersucht.

a) Material und Methoden

Protoporphyrin IX (P-8293, Sigma-Aldrich, Taufkirchen; Strukturformel s. Abb. 2.19) wurde ohne zusätzliche Reinigung in DMSO aufgelöst und für ca. 10 min ins Ultraschallbad gestellt, um eine vollständige Auflösung zu erreichen.

Die Messung der spektralen Eigenschaften erfolgte mit den in Abschnitt 2.3.2 beschriebenen Methoden und Versuchsanordnungen.

¹⁰Protoporphyrin ist sogar so hydrophob, dass es nur durch die sehr lipidreiche Galle ausgeschieden werden kann, wohingegen Uroporphyrin und Coproporphyrin größtenteils im Urin zu finden sind [KSG89].

Bande	PpIX-Dimethylester		PpIX (freie Säure)	
	CHCl ₃	DMSO	DMSO	Blutplasma
Soret	405	404	406	409
Min	463	463	465	—
1. Q-Bande	503	503	505	505
Min	523	522	524	524
2. Q-Bande	539	538	540	539
Min	557	556	558	554
3. Q-Bande	574	572	574	569 u. 595 [†]
Min	608	608	610	632 [†]
4. Q-Bande	628	627	629	648 [†]

[†] In Blutplasma erscheint das 3. Maximum als zwei getrennte Banden und das 4. Maximum sehr viel langwelliger als bei den übrigen Lösungsmitteln: Grund hierfür können Aggregationen von PpIX und/oder Bindungen von PpIX an Proteine sein.

Tabelle 2.6: *Absorptionsmaxima und -minima (nm) von Protoporphyrin IX-Dimethylester und Protoporphyrin IX als freie Säure in verschiedenen Lösungsmitteln.*

b) Ergebnisse

Abb. 2.21 (oben) zeigt den Absorptionsquerschnitt von PpIX in DMSO für verschiedene Konzentrationen. Die Absorptionsmaxima für Monomere (kleinste Konzentration) lagen bei $\lambda_{\max} = 406 \text{ nm}$ (Soret-Bande), 505 nm , 540 nm , 574 nm und 629 nm (Q-Banden). Mit steigender Konzentration war eine Zunahme der Absorption aufgrund von Wechselwirkungen der Farbstoffmoleküle zu beobachten.

Die Zunahme der Absorption von der niedrigsten Konzentration ($C = 7,6 \times 10^{-7} \text{ mol dm}^{-3}$) zur höchsten Konzentration ($C = 1,2 \times 10^{-2} \text{ mol dm}^{-3}$) beträgt an den Maxima zwischen 5 % (Soret-Bande) und 40 % (Q-Banden) und wird mit steigender Wellenlänge größer. Für $C = 1,2 \times 10^{-2} \text{ mol dm}^{-3}$ zeigt die Soret-Bande für Wellenlängen $\lambda \leq \lambda_{\max}$ eine deutliche Verbreiterung, die auf die Bildung von Dimeren oder Wechselwirkungen von eng benachbarten Molekülen zurückzuführen ist (siehe unten).

Die Fluoreszenzquantenverteilungen von PpIX in DMSO für verschiedene Konzentrationen zeigt Abb. 2.22. Bis $C = 1,2 \times 10^{-2} \text{ mol dm}^{-3}$ nimmt die Fluoreszenzverteilung mit steigender Konzentration im gesamten Detektionsintervall ab. Für $C = 2,3 \times 10^{-2} \text{ mol dm}^{-3}$ steigt die Fluoreszenzverteilung für Wellenlängen größer 655 nm steiler an und ist ab 720 nm größer als bei den übrigen Konzentrationen.

Abb. 2.23 (oben) zeigt die Fluoreszenzquantenausbeute ϕ_F in Abhängigkeit von der Konzentration. Die Quantenausbeute der Monomere bei niedrigen Konzentrationen ist $\phi_F = 0,134 \pm 0,008$. Mit steigender Konzentration nimmt die Quantenausbeute bis $C = 1,2 \times 10^{-2} \text{ mol dm}^{-3}$ ab. Für $C = 2,3 \times 10^{-2} \text{ mol dm}^{-3}$ ergibt sich wegen der erhöhten Fluoreszenz ab 655 nm auch insgesamt eine höhere Fluoreszenzquantenausbeute als für $C = 1,2 \times 10^{-2} \text{ mol dm}^{-3}$.

c) Aggregation

Mit steigender Konzentration müssen Aggregationseffekte betrachtet werden. In DMSO ist für $C \gtrsim 3 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$ eine Verschiebung des Absorptionsmaximums um etwa $1,5 \text{ nm}$ zu kleineren Wellenlängen hin zu beobachten (Abb. 2.24 (oben)). Haben die Monomere und Dimere eines Farbstoffes nur gering unterschiedliche Absorptionsmaxima, dann kann die Verschiebung des Absorptionsmaximums der Einhüllenden (von Monomer- und Dimerspektrum) auf die Ausbildung der Dimer-Absorptionsbande hinweisen. Andererseits ist die Verbreiterung einer Absorptionsbande, wie dies für $C = 1,2 \times 10^{-2} \text{ mol dm}^{-3}$ für die Soret-Bande bei Wellenlängen $\lambda \leq \lambda_{\max}$ der Fall ist, charakteristisch für Wechselwirkungsprozesse von Molekülen, die sich aufgrund der

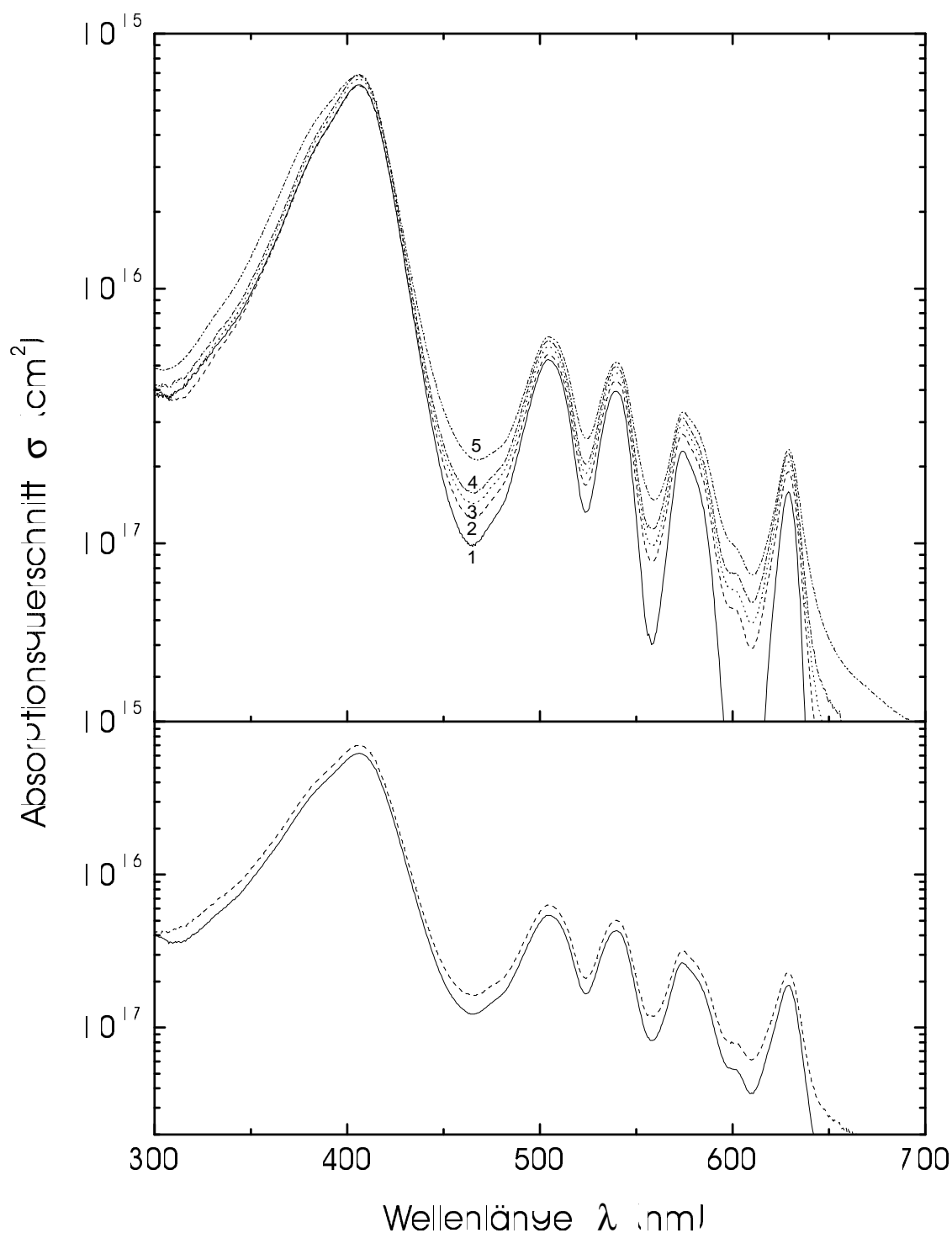


Abbildung 2.21: **Oben** Absorptionsquerschnitt von PpIX in DMSO für verschiedene Farbstoffkonzentrationen (mol dm^{-3}): (1) $7,6 \times 10^{-7}$; (2) $3,8 \times 10^{-6}$; (3) $1,5 \times 10^{-4}$; (4) 3×10^{-3} ; (5) $1,2 \times 10^{-2}$. **Unten** Absorptionsquerschnitt von PpIX in DMSO für Monomere (durchgezogene Linie) und Dimere (gestrichelte Linie) (Erläuterungen siehe Text).

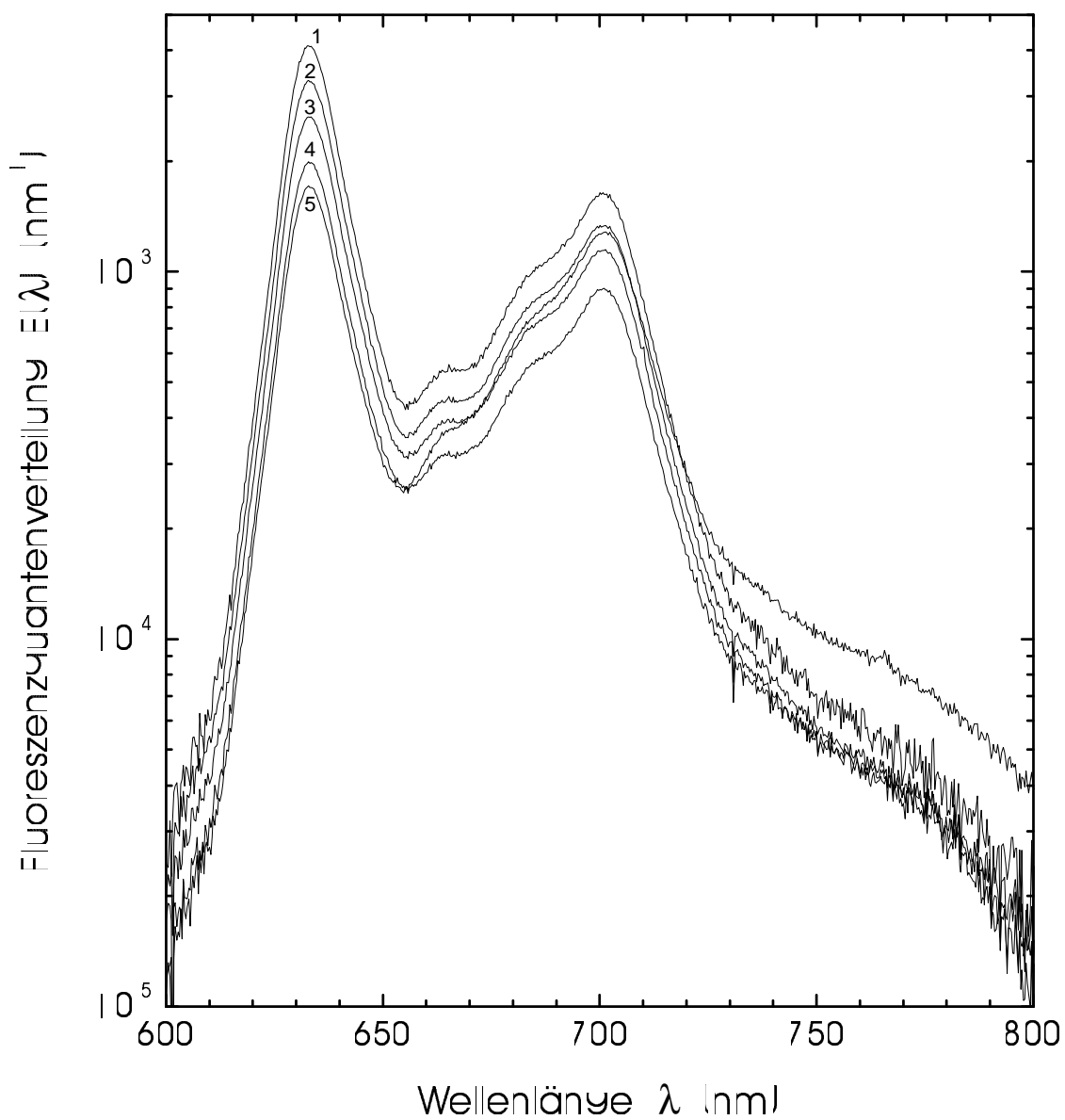


Abbildung 2.22: Fluoreszenzquantenverteilung $E(\lambda)$ von PpIX in DMSO für verschiedene Farbstoffkonzentrationen (mol dm^{-3}): (1) $1,2 \times 10^{-6}$; (2) $5,6 \times 10^{-5}$; (3) $3,6 \times 10^{-3}$; (4) $1,2 \times 10^{-2}$; (5) $2,3 \times 10^{-2}$.

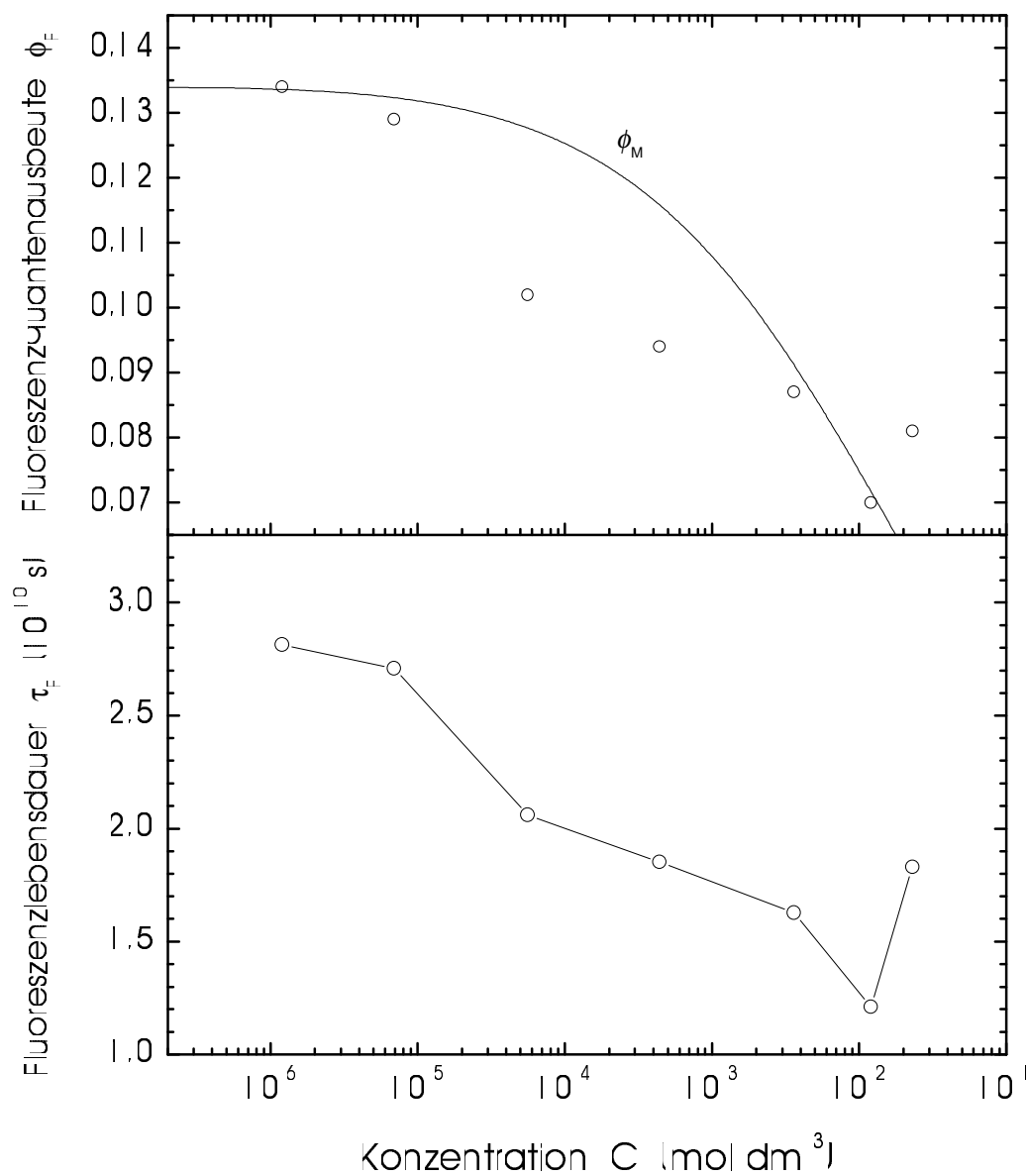


Abbildung 2.23: Oben Fluoreszenzquantenausbeute ϕ_F von PpIX in DMSO in Abhängigkeit von der Farbstoffkonzentration. Die eingezeichnete Kurve entspricht den Gl. (2.35)–(2.37). Unten Fluoreszenzlebensdauer τ_F von PpIX in DMSO in Abhängigkeit von der Farbstoffkonzentration.

Brownschen Molekülbewegung statistisch bedingt sehr nahe kommen [For51, LP86]. Der mittlere Molekülabstand beträgt für $C = 1,2 \times 10^{-2} \text{ mol dm}^{-3}$ nur etwa $d = 5,7 \text{ nm}$ ($d = (0,74 C N_A)^{-1/3}$; 0,74 ist der Volumenanteil einer hexagonal dichtesten Kugelpackung).

Bei Dimerbildung oder Wechselwirkungen zwischen benachbarten Molekülen ist auch eine Zunahme der Absorption mit steigender Konzentration denkbar, wenn die Elektronenorbitale der Atome derart beeinflusst werden, dass bestimmte Übergänge zugunsten anderer Übergänge unwahrscheinlicher werden. Bei Porphyrinen wird die Form und Stärke der Soret-Bande in erster Linie durch das π -Elektronensystem der Ringatome festgelegt, während die Q-Banden überwiegend durch die Zahl und Art der Seitenketten bestimmt werden. Die beobachtete Absorptionszunahme mit steigender Konzentration und Wellenlänge ist demnach durch eine Immobilisierung der Seitengruppen bei einsetzender Aggregation und eine Begünstigung der Übergänge in das erste angeregte Singulett-Niveau 1S_1 erklärbar (siehe dazu Abb. 2.6).

Die Aggregation von Dimeren und eng benachbarten Molekülen lassen sich mit den Gl. (2.11)–(2.14) beschreiben.

d) Absorptionsverhalten

Das Absorptionsverhalten von PpIX in DMSO (Abb. 2.21 (oben)) kann bis zu $C \approx 10^{-2} \text{ mol dm}^{-3}$ durch die Bildung von Dimeren beschrieben werden. Das Absorptionsspektrum setzt sich dann gemäß Gl. (2.25) zusammen aus dem Absorptionsquerschnitt für Monomere (σ_M) und dem Absorptionsquerschnitt für Dimere, jeweils gewichtet mit den entsprechenden Mol-Anteilen (χ_M für Monomere und χ_D für Dimere, Gl. (2.14)).

Bei niedrigen Konzentrationen ($C < 10^{-7} \text{ mol dm}^{-3}$) wird χ_D klein und der gemessene Absorptionsquerschnitt $\sigma(\lambda)$ entspricht $\sigma_M(\lambda)$. Analog zu den Berechnungen bei ICG-NaI kann aus der Konzentrationsabhängigkeit von $\sigma(\lambda_{\max})$ die Dimerisierungskonstante K_D abgeschätzt werden (Abb. 2.24 (unten)). Das Ergebnis der Anpassung ist $K_D = 1,1 \times 10^4 \text{ dm}^3 \text{ mol}^{-1}$, wenn $\sigma_D(404,5 \text{ nm}) = 6,9 \times 10^{-16} \text{ cm}^2$ und $\sigma_M(406 \text{ nm}) = 6,3 \times 10^{-16} \text{ cm}^2$ angenommen wird.

Den Monomer- und Dimer-Absorptionsquerschnitt erhält man aus zwei Absorptionsspektren $\sigma(\lambda, C_1)$ und $\sigma(\lambda, C_2)$, wenn man Gl. (2.25) nach $\sigma_M(\lambda)$ bzw. $\sigma_D(\lambda)$ auflöst (Gl. (2.26) und (2.27)). Zur Berechnung der Absorptionsquerschnitte von Monomeren und Dimeren in Abb. 2.21 (unten) wurden die Konzentrationen $C_1 = 3,8 \times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$ (2) und $C_2 = 1,5 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$ (4) aus Abb. 2.21 (oben) verwendet.

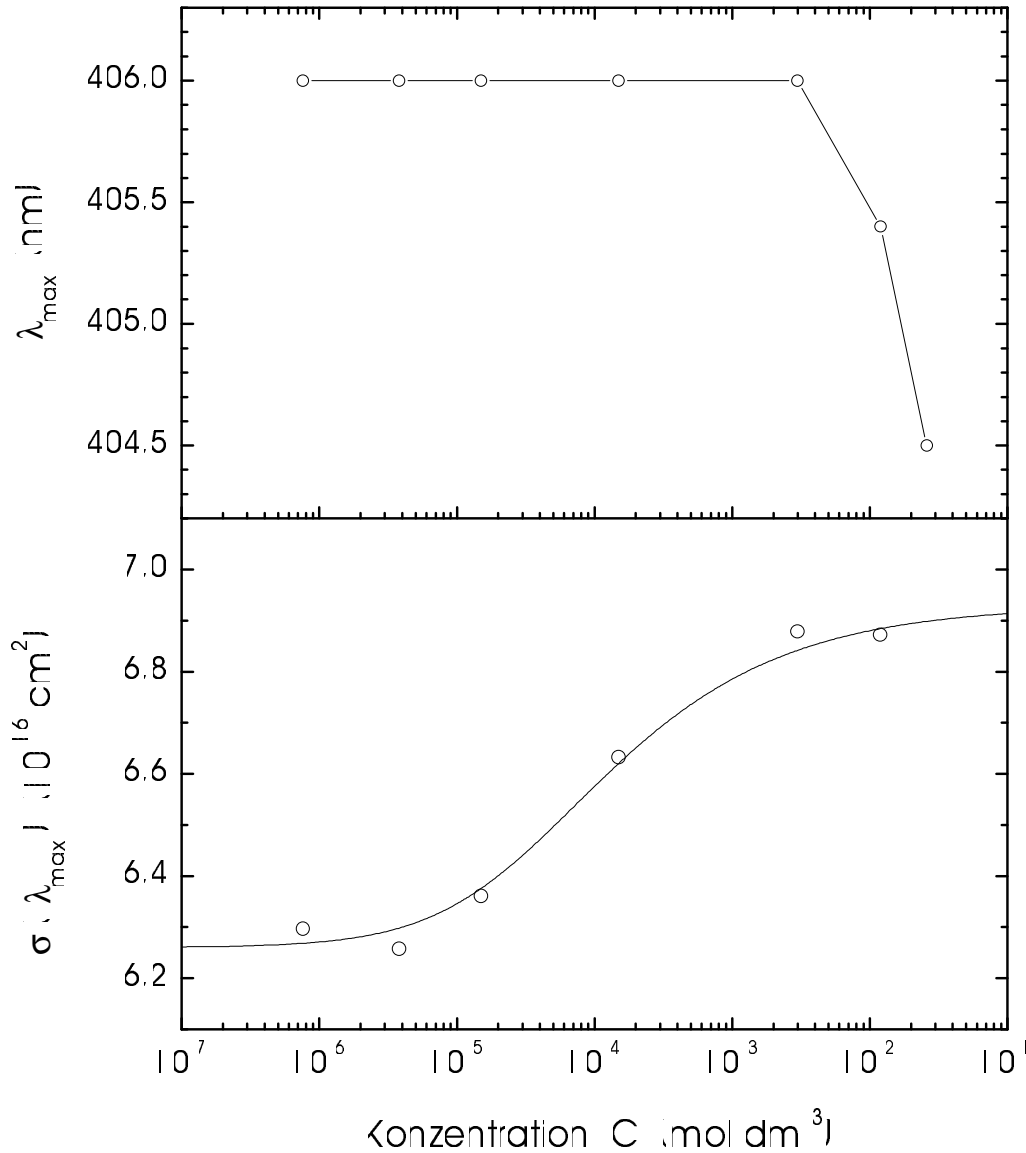


Abbildung 2.24: **Oben** Absorptionsmaximum λ_{max} von PpIX in DMSO vs. Konzentration (Daten aus Abb. 2.21 (oben)). **Unten** Absorptionsquerschnitt $\sigma(\lambda_{\text{max}})$ von PpIX in DMSO vs. Konzentration (Daten ebenfalls aus Abb. 2.21 (oben)). Die eingezeichnete Kurve ist die nicht-lineare Regression [NM65] der Gl. (2.25) und (2.14) an die experimentellen Daten (physically bound ground state dimer fit). Die Parameter des Fits sind $K_D = 1,1 \times 10^4 \text{ dm}^3 \text{ mol}^{-1}$, $\sigma_D(404,5 \text{ nm}) = 6,9 \times 10^{-16} \text{ cm}^2$ und $\sigma_M(406,0 \text{ nm}) = 6,3 \times 10^{-16} \text{ cm}^2$ ($R^2 = 0,9839$).

e) Emissionsverhalten

Die Fluoreszenzquantenverteilungen $E(\lambda)$ und Fluoreszenzquantenausbeuten ϕ_F von PpIX in DMSO sind in den Abb. 2.22 und 2.23 (oben) dargestellt. Aus diesen Daten kann mithilfe der Strickler-Berg-Formel (Gl. (2.30)) die natürliche Strahlungslebensdauer τ_{rad} der angeregten Zustände ermittelt werden. τ_{rad} war (mit Ausnahme von $C = 2,3 \times 10^{-2} \text{ mol dm}^{-3}$) unabhängig von der Konzentration und erreichte für Monomere einen Wert von $\tau_{\text{rad}} = 2,1 \pm 0,3 \text{ ns}$.

Die Fluoreszenzlebensdauern τ_F sind durch $\tau_F = \phi_F \tau_{\text{rad}}$ festgelegt und in Abb. 2.23 (unten) in Abhängigkeit von der Konzentration dargestellt. Für $C = 2,3 \times 10^{-2} \text{ mol dm}^{-3}$ multiplizieren sich die jeweils höheren Werte für ϕ_F und τ_{rad} und ergeben $\tau_F = 1,83 \times 10^{-10} \text{ s}$.

Durch die Anwesenheit von Dimeren und größeren Aggregatverbänden von PpIX-Molekülen wird die Fluoreszenzquantenausbeute der Monomere vermindert, da Energietransfer von angeregten Monomeren auf weniger stark fluoreszierende Moleküle stattfindet. Die kritische Distanz für Energietransfer R_0 (Förster-Radius, Gl. (2.33)) und die über $C_0 = (0,74 N_A R_0^3)^{-1}$ verbundene kritische Konzentration für PpIX in DMSO sind $R_0 = 2,5 \text{ nm}$ und $C_0 = 1,4 \times 10^{-1} \text{ mol dm}^{-3}$. Die relativ hohe kritische Konzentration für Energietransfer liegt bereits über der Löslichkeitsgrenze und ist der Grund dafür, dass die Fluoreszenzquantenausbeute für PpIX in DMSO weitaus weniger stark mit steigender Konzentration abnimmt wie für andere Farbstoffe (z. B. ICG). Zur Berechnung wurden die Fluoreszenzquantenverteilung $E(\lambda)$ und der Absorptionsquerschnitt $\sigma(\lambda)$ für die kleinste Konzentration $C = 1,2 \times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$ verwendet.

Sind Fluoreszenzquantenverteilung $E(\lambda)$ und strahlende Lebensdauer τ_{rad} (Gl. (2.30)) bekannt, kann mithilfe von Gl. (2.40) der Wirkungsquerschnitt für die stimulierte Emission σ_{em} errechnet werden. Der Emissionsquerschnitt σ_{em} für PpIX in DMSO ist zusammen mit dem Absorptionsquerschnitt σ_{abs} in Abb. 2.25 dargestellt.

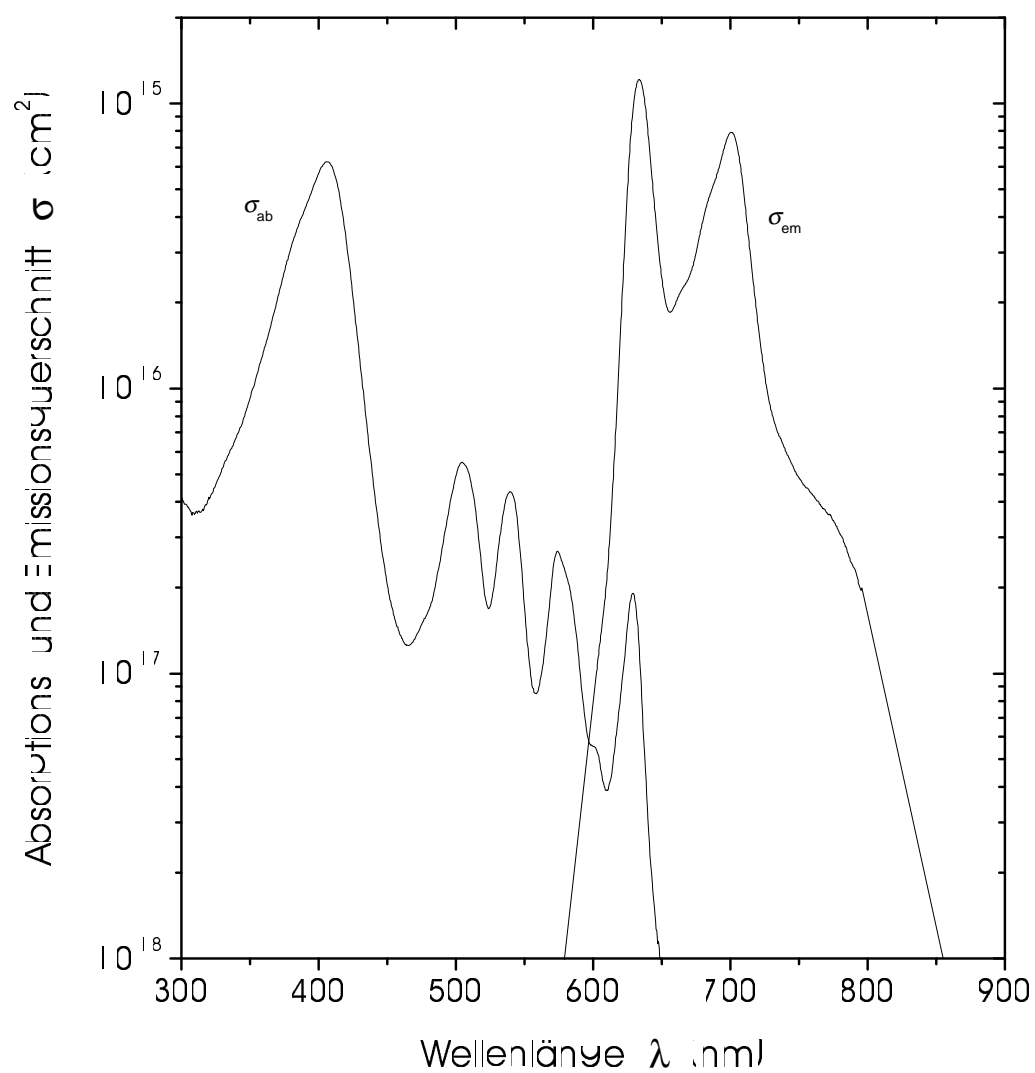


Abbildung 2.25: Absorptions- (σ_{abs}) und stimulierter Emissions-Wirkungsquerschnitt (σ_{em}) von PpIX-Monomeren in DMSO.

Kapitel 3

Fluoreszenzdiagnostik *in vivo*

Nachdem in den beiden vorherigen Kapiteln die Auswirkungen der optischen Eigenschaften der Haut auf die Fluoreszenzdiagnostik (FD) und die spektralen Eigenschaften der Fluorophore untersucht wurden, soll jetzt der Einfluss von physikalischen Faktoren *in vivo* und Anwendungen der FD vorgestellt werden.

Um bei der FD eine möglichst hohe Lichtausbeute zu erzielen, muss das eingestrahlte Anregungslicht effizient in Fluoreszenzlicht umgesetzt werden. Die Ausbreitung des Anregungslichts beim Eindringen in das Gewebe wird durch die optischen Eigenschaften der Haut festgelegt (Kapitel 1). Damit möglichst viel Licht absorbiert werden kann, muss der Farbstoff selektiv und mit hoher Konzentration im Gewebe angereicht werden. Für PpIX wird die Konzentration, mit der der Farbstoff im Gewebe vorliegt, durch die Penetration von ALA durch das Stratum corneum und die Hämbiosyntheseaktivität bestimmt. Die Penetration von ALA durch die Haut kann zwar durch Substanzen wie DMSO und EDTA gefördert werden [MKR95], da aber auch die Penetration durch normaler Haut gesteigert wird bleibt zu untersuchen, ob dadurch die Selektivität gesteigert wird. Die Hämbiosynthese hängt von der Stoffwechselaktivität des Patienten ab und kann nicht beeinflusst werden.

Wird der im Gewebe angereicherte Farbstoff vom Anregungslicht erreicht, strahlt er mit der Wahrscheinlichkeit ϕ_F (Fluoreszenzquantenausbeute) Fluoreszenzlicht isotrop in das Gewebe ab. Die Fluoreszenzquantenausbeute ist abhängig von der Umgebung der Farbstoffmoleküle (Lösungsmittel) und nimmt mit steigender Konzentration ab (Kapitel 2). Im Gewebe kann die Fluoreszenzintensität zusätzlich durch photochemische Reaktionen (Ausbleichen der Farbstoffe) und die Reabsorption von Fluoreszenzlicht vermindert werden. Für PpIX und ICG wird in den Abschnitten 3.2.2 und 3.2.3 die Größenordnung dieser fluoreszenzlöschenden Konkurrenzprozesse abgeschätzt.

3.1 Methoden zur Quantifizierung

Hat das Fluoreszenzlicht die Grenzfläche Gewebe | Luft passiert, kann es durch unterschiedliche Methoden detektiert und quantifiziert werden. Bei nicht-invasiven Detektionsmethoden¹ [PCP86] wird die Fluoreszenz ausserhalb des Gewebes gemessen und die aus dem Volumenelement $dV = dx dy dz$ stammende Fluoreszenz erscheint für den Detektor so, als ob sie von der Oberfläche des Gewebes ausgehen würde. Formal kann dieser Umstand durch eine Abbildung vom 3-dimensionalen in den 2-dimensionalen Vektorraum beschreiben werden: $F(x, y, z) \mapsto F'(x', y')$. Wegen der auftretenden Streuung sind die Flächenstücke $dx dy$ und $dx' dy'$ nicht identisch. Befindet sich also der Detektor ausserhalb des Gewebes, geht die Tiefeninformation, die im Fluoreszenzsignal enthalten ist, in der Regel verloren.²

Die Fluoreszenzintensität kann mithilfe von Spektrometern oder Monochromatoren spektral aufgelöst oder nach kurzzeitiger Anregung und mit genügend schnellen Messverfahren auch zeitaufgelöst detektiert werden.

3.1.1 Fluoreszenzspektroskopie

Bei der Fluoreszenzspektroskopie wird die Fluoreszenzintensität I_F in Abhängigkeit von der Wellenlänge λ gemessen: $I_F = I_F(\lambda)$. Das Prinzip der Fluoreszenzspektroskopie für den diagnostischen Einsatz beruht darauf, dass sich die Fluoreszenzspektren von erkranktem vs. gesundem Gewebe durch die unterschiedlichen Konzentrationen von endogenen oder exogenen Farbstoffen oder aufgrund der strukturellen Zusammensetzung des Gewebes unterscheiden (s. Abschnitt 2.1.3).

Spektroskopische Verfahren eignen sich besonders gut dann, wenn die spektralen Fluoreszenzunterschiede gering (wie z. B. bei der Autofluoreszenz) oder die zu untersuchenden Areale schwer zugänglich sind (z. B. Hohlorgane: Speiseröhre, Magen, Darm, Bronchien, Lunge) und die Normierung der gemessenen Intensitäten nur durch Verhältnissbildung bei verschiedenen Wellenlängen möglich ist [SSF96, Ram00]. Die Anregung

¹Im Gegensatz zu nicht-invasiven Methoden ist auch eine invasive Fluoreszenzdetektion möglich: *Ex vivo* in sehr dünnen Gewebeschnitten unter dem Fluoreszenzmikroskop [Ros92, SSL94] oder *in vivo* durch Einbringen von Lichtleitern in das Gewebe.

²Zur Auswertung der Tiefeninformation müsste die Laufzeit des Fluoreszenzlichts im Gewebe gemessen werden. Diese wird aber ebenfalls durch Streuung verfälscht und lässt das Fluoreszenzlicht aus einer größeren Tiefe kommend erscheinen. Wegen der äußerst kurzen Laufzeiten und der Abklingzeit der Fluoreszenz ist die technische Durchführung einer solchen Messung jedoch schwierig.

und Detektion der Fluoreszenz erfolgt meist durch Lichtfasern. Dabei wird das Anregungslicht durch eine einzelne Faser oder ein Faserbündel zum Gewebe geleitet und das Fluoreszenzlicht durch die selbe Faser (dies macht die optische Trennung vom Anregungslicht mithilfe eines dichroiden Spiegels notwendig [LRS96]) oder separate Fasern gesammelt. Zur Anregung werden Laser [AEC96, LB96, ACC00], die in einem sehr schmalen Wellenlängenbereich genügend Intensität liefern können, oder inkohärente Lichtquellen eingesetzt [HSH99, Leo99].

Um die geringen spektralen Unterschiede zwischen Tumor- und Normalgewebe herauszufiltern, wird durch Verhältnisbildung der Intensitäten bei verschiedenen Detektions- und/oder Anregungswellenlängen die Spezifität erhöht [LRS96, AKS97] oder es werden mathematische Algorithmen angewendet [OKR98]. Der große Nachteil aller klassischen, spektroskopischen Methoden ist, dass die Messungen nur punktuell erfolgen können und wegen der geringen Lichtausbeute längere Integrationszeiten notwendig sind. Dies schließt in der Regel eine Bildgebung aus. Abhilfe kann hier das *Ratio-* oder *Multicolor-Imaging* schaffen: Dabei werden die drei Farbkanäle (Rot, Grün, Blau) einer CCD-Farbkamera genutzt, um gleichzeitig Bilder im blauen (420–480 nm), grün-gelben (480–580) und roten Spektralbereich (580–750 nm) zu generieren. Durch Kombination dieser Bilder ($(R - k_1 G)/k_2 B$; $k_{1,2}$ sind Konstanten, deren Werte an die jeweilige Applikation angepasst sind) kann eine orts aufgelöste, d. h. bildgebende, quasi-spektroskopische Darstellung der Fluoreszenzintensität in Abhängigkeit obiger Farbbereiche $\Delta\lambda$ erreicht werden: $I_F = I_F(\Delta\lambda, x, y)$ [ACC00, SHS00].

3.1.2 Zeitaufgelöste Fluoreszenzmessung

Das Abklingen der Fluoreszenzintensität $I(t)$ kann in erster Näherung durch eine monoexponentielle Funktion der Zeit ($I(t) = I(t=0) \exp(-t/\tau_F)$; τ_F ist die Fluoreszenzabklingzeit) beschrieben werden. Durch zeitaufgelöste Messungen kann die Fluoreszenzabklingzeit ermittelt werden. Dazu wird die Fluoreszenzintensität nach kurzzeitiger Anregung in mehreren schmalen Zeitfenstern gemessen und durch lineare Regression an die exponentielle Funktion angepasst [CPT95, ACC00]. Da die Detektion meist mit gateden CCD-Kameras erfolgt, kann τ_F auch orts aufgelöst bestimmt werden: $I_F = I_F(\tau_F, x, y)$ [CCT93, CCP97, ACC00].

Die Unterscheidung von krankem vs. gesundem Gewebe erfolgt in der Regel durch die längere Abklingzeit der Fluoreszenz von exogenen Farbstoffen wie Porphyrinen im Vergleich zur Autofluoreszenz des Gewebes [AJS90b, CCT93]. Die Abklingzeit ist stark vom Mikromilieu des Farbstoffmoleküls abhängig (τ_F reagiert sehr sensitiv auf

lokale Änderungen von pH-Wert, Aggregations- und Bindungsverhältnissen [WPH92]), nicht aber von der Anregungsintensität. Der Vorteil von zeitaufgelösten gegenüber integrativen Fluoreszenzmessungen ist deshalb, dass die generierten Bilder unabhängig von der Anregungsgeometrie sind und die Autofluoreszenz des Gewebes sehr viel besser diskriminiert werden kann.

3.1.3 Integrative Fluoreszenzmessung

Um das Ergebnis der FD mit dem Hautbefund und der Histologie des Patienten zu korrelieren, ist die orts aufgelöste Darstellung der Fluoreszenz am besten geeignet. Die Sensitivität der Fluoreszenzmessung kann durch Integration der Fluoreszenzintensität über ein Wellenlängenintervall und die Zeit gesteigert werden: $I_F = I_F(\Delta\lambda, \Delta t, x, y)$. Bei genügend kleinem Zeitintervall Δt kann die Fluoreszenz in „Echtzeit“ (25 Bilder pro Sekunde) dargestellt werden (*real time imaging*). Das detektierte Wellenlängenintervall richtet sich nach dem Emissionsspektrum des Farbstoffes und wird in der Regel durch einen Langpassfilter ($\Delta\lambda = [\lambda_c, \infty]$) diskriminiert. λ_c wird so gewählt, dass möglichst wenig Anregungslicht und möglichst viel Fluoreszenzlicht detektiert wird.

Der Vorteil von integrativen Quantifizierungsmethoden liegt in der hohen Lichtausbeute, die durch die Integration erreicht wird, und in der mit wenig Aufwand verbundenen Technik. Im Gegensatz zu spektroskopischen und zeitaufgelösten Methoden reichen zur Durchführung von integrativen Messverfahren meist inkohärente Lichtquellen (Xenon-, Halogen und Quecksilberlampen, Wood-Lampen [FBM97]) und wenig empfindliche Detektoren aus. Durch das „Aufsammeln“ der Lichtquanten verschiedener Wellenlängen im Intervall $\Delta\lambda_i$ ist die Lichtausbeute bei gleicher Integrationszeit um den Faktor $\Delta\lambda_i/\Delta\lambda_s$ größer als bei einem spektroskopischen Verfahren, wenn $\Delta\lambda_s$ das Auflösungsvermögen des Spektrometers oder Monochromators ist. Nimmt man für die Detektion von Porphyrinen $\lambda_c = 610 \text{ nm}$ (s. Abschnitt 3.4.4) und für $\Delta\lambda_s = 0,5 \text{ nm}$ an, dann beträgt der Faktor $\Delta\lambda_i/\Delta\lambda_s$ je nach Wellenlänge etwa 20–400. Als Detektoren können CCD-Kameras, Ratiofluorometer oder, bei stark fluoreszierenden Farbstoffen und selektiver Anreicherung (z. B. Porphyrinen), das Auge verwendet werden (Tab. 1 in Ref. [AAK00]).

Durch die Integration der Fluoreszenz ist die hohe Lichtausbeute aber mit einer geringen Spezifität bezüglich der verschiedenen Fluorophore verbunden. Aufgrund der Eigenfluoreszenz des Gewebes stammt ein Teil des Fluoreszenzlichts insbesondere bei Anregung nahe dem UV (z. B. Soret-Bande von Porphyrinen) von endogenen Chromophoren; die Autofluoreszenz des Gewebes kann mit digitaler Bildverarbeitung wieder

diskriminiert werden. Durch Inhomogenitäten im Anregungslicht und der physiologisch bedingten Wölbung der Gewebeoberfläche entsteht zudem ein Gradient in der Anregungsintensität, der durch Shading-Korrektur behoben werden kann (s. dazu Abschnitt 3.4.4).

3.2 Fluoreszenzbeeinflussende Faktoren

Die Fluoreszenzemission von Farbstoffen wird stärker als die Absorption von der Umgebung beeinflusst. Durch fluoreszenzlöschende Prozesse kann die Fluoreszenzausbeute ϕ_F vermindert werden, sodass weniger Fluoreszenzphotonen bei konstanter Anregungsintensität erzeugt werden (s. Abschnitte 2.4 und 2.5). Im Gewebe können die Fluoreszenzphotonen von den Farbstoffmolekülen reabsorbiert werden, was zur erneuten Emission von Fluoreszenzlicht führen kann. Die Fluoreszenz wird zudem durch photochemische Reaktionen, die ein Ausbleichen der Farbstoffe bewirken, beeinflusst.

3.2.1 Ausbleichen von Farbstoffen

Durch ihre zusätzliche Energie sind Moleküle in angeregten Zuständen meist reaktiver als im zugehörigen Grundzustand. Ausgehend vom niedrigsten Vibrationsniveau eines Singulett- oder angeregten Triplett-Zustandes, der durch seine längere Lebensdauer mehr Möglichkeiten zu chemischen Reaktionen hat, können irreversible Veränderungen (Zersetzung, Polymerisation oder Reaktionen mit anderen Molekülen) auftreten.³

Während der Bestrahlung können deshalb neue, nicht-fluoreszierende Moleküle oder Moleküle mit veränderten Fluoreszenzeigenschaften gebildet werden oder bei der Anregungswellenlänge weniger absorbierende Produkte entstehen. Da die Reaktionsprodukte in der Regel sehr viel weniger Fluoreszenzlicht als der ursprüngliche Farbstoff erzeugen können, wird die Lichtausbeute des Farbstoffes herabgesetzt (*Photobleaching*). In den meisten Fällen geht das Ausbleichen der Farbstoffe auf Reaktionen zwischen angeregten Fluorophoren und Sauerstoff zurück, aber auch nicht-oxidative Mechanismen [JDM82] oder eine Kombination dieser Mechanismen [PK84] sind möglich.

Die Ausbleichrate hängt vom Absorptionskoeffizienten des Farbstoffes, seiner chemischen Umgebung und der Energiedichte des Bestrahlungslichts ab. Da die Energiedichte durch die Lichtintensität (W/cm^2) und Bestrahlungsdauer (s) festgelegt ist,

³Angeregte Moleküle, die mit Molekülen im Grundzustand polymerisieren, bilden sog. *Excimer*, die ein im Vergleich zum Monomer unterschiedliches Emissionsspektrum aufweisen.

sollte die FD mit möglichst geringer Anregungsintensität und kurzen Bestrahlungszeiten (evtl. gepulst) durchgeführt werden. Die Ratenkonstante von PpIX für die Bildung von Photoprodukten *in vitro* liegt im Bereich $50\text{--}70\text{ cm}^2\text{ W}^{-1}\text{ h}^{-1}$ [JJG93, Ram97]; für Indocyaningrün wurden anfängliche Übergangswahrscheinlichkeiten von angeregten Singulett-Zuständen in Leukoformen (Lösen einer Doppelbindung) oder Fragmente (aromatische Endgruppen sind noch intakt) von etwa 10^{-3} in Wasser, schwerem Wasser und Natriumazid, 10^{-5} in Methanol und DMSO und 2×10^{-6} in humanem Plasma gemessen [HMP98].

3.2.2 Fluoreszenzlöschung

Ausgehend von einem angeregten Zustand eines Farbstoffmoleküls kann die Fluoreszenzquantenausbeute ϕ_F durch fluoreszenzlöschende Konkurrenzprozesse stark zurückgehen. Dieser Vorgang wird im weitesten Sinne als *Quenching* bezeichnet. Bei der Fluoreszenzlöschung kann das Fluorophor im Verlauf der Kollision mit einem Quenchemolekül seine Energie auf dieses übertragen und selbst wieder in den Grundzustand zurückgehen (*dynamische Fluoreszenzlöschung*) oder durch Komplexbildung mit dem Quencher nach Lichtabsorption strahlungslos in den Grundzustand relaxieren (*statische Fluoreszenzlöschung*).

Rückschlüsse auf die Art der Fluoreszenzlöschung kann man durch Auftragen des Verhältnisses der Fluoreszenzintensitäten ohne und mit Quencher (I_F^0/I_F) gegen die Quencherkonzentration $[Q]$ (*Stern-Volmer-Plot*) bei verschiedenen Temperaturen ziehen [Rod99]. Während bei der dynamischen Löschung aufgrund der Zunahme der Stöße zwischen Farbstoff- und Quenchemolekülen mit steigender Temperatur ein steilerer Anstieg von I_F^0/I_F vs. $[Q]$ beobachtet wird, kommt es bei statischer Löschung zu einem flacheren Verlauf, da sich das Gleichgewicht zwischen freien und komplexierten Fluorophoren mit steigender Temperatur zu Gunsten der freien Fluorophore verschiebt.

Da in der Regel eine Überlagerung der beiden Mechanismen vorliegt (*kombinierte Fluoreszenzlöschung*), können die meisten Quenchingphänomene auf den Einfluss von Temperatur, Sauerstoff, der Umgebung oder der Konzentration zurückgeführt werden.⁴

Temperatur-Quenching

Bei überwiegend dynamischer Fluoreszenzlöschung ist eine Abnahme der Fluoreszenzintensität mit steigender Temperatur zu beobachten. Die Stärke der Temperatur-

⁴Dies macht man sich z. B. bei *optischen Sensoren* zunutze, mit denen sehr sensitiv Gase oder die Temperatur durch Fluoreszenzlöschung gemessen werden [LKF00].

abhängigkeit wird bestimmt durch die Farbstoff- und Quencher-moleküle und beträgt gewöhnlich 1 % (z. B. Protoporphyrin [RGJ95]) bis 5 % (z. B. Tryptophan, Rhodamin B [Ros92]) pro Kelvin.

Der Effekt des Temperatur-induzierten Quenching kann durch eine Zunahme der Molekülbewegungen mit steigender Temperatur erklärt werden: In der Folge kommt es zu häufigeren Kollisionen von angeregten Farbstoffmolekülen mit Farbstoffmolekülen im Grundzustand (Konzentrations-Quenching) oder anderen Molekülen (z. B. Sauerstoff-Quenching), bei denen das Farbstoffmolekül Energie abgeben und strahlungslos in den Grundzustand relaxieren kann.

Quenching durch Umgebungsmoleküle

Ein angeregtes Farbstoffmolekül kann seine überschüssige Energie an ein benachbartes Molekül abgeben und dieses selbst in einen angeregten Zustand bringen. Ist das zweite Molekül nicht-fluoreszierend, wird die effektive Quantenausbeute des Farbstoffes dadurch herabgesetzt. Da der Energietransfer eines Donator-Moleküls an ein Akzeptor-Molekül sehr effizient sein und über Entfernungen bis zu 1 μm ablaufen kann, können schon geringe Mengen an geeigneten Umgebungsmolekülen eine starke Fluoreszenzlöschung bewirken.

Wenn andererseits der Donator nicht-fluoreszierend und der Akzeptor fluoreszierend ist, kann die Fluoreszenz des Akzeptors stark ansteigen, wenn der Donator die Anregungsphotonen besser absorbieren kann (*sensitized fluorescence*).

Sauerstoff-Quenching

Einer der häufigsten Quencher ist molekularer Sauerstoff, der die Fluoreszenz deutlich schwächen und die Phosphoreszenz komplett aufheben kann. Gelöster Sauerstoff mit der Konzentration 1 mmol/Liter reduziert die Fluoreszenzintensität typischerweise um etwa 20 % [Gui73].

Konzentrations-Quenching

Bei hohen Konzentrationen nimmt die Fluoreszenzquantenausbeute von Farbstoffen ab. Dies führt zu einem nicht-linearen Zusammenhang zwischen Farbstoffkonzentration und Fluoreszenzintensität und zur Fehleinschätzung der Farbstoffkonzentration.

Die gemessene Fluoreszenzintensität I_F wird bestimmt durch das vom Farbstoff absorbierte Licht I_A , die Fluoreszenzquantenausbeute ϕ_F sowie durch die optischen Eigenschaften des Gewebes und die Detektionsgeometrie, die jeweils von der Wellenlänge abhängen und durch $\gamma(\lambda)$ repräsentiert werden [Ros92]:

$$I_F = \gamma(\lambda) I_A \phi_F \quad (3.1)$$

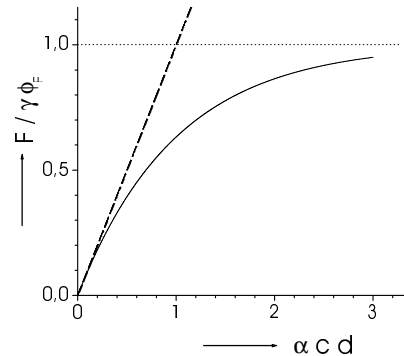
Vernachlässigt man Absorptions- und Streueffekte des Gewebes und geht von einer homogenen Verteilung des Farbstoffes im Gewebe aus (Verhältnisse wie in einer Farbstofflösung), dann ergibt sich der Anteil an absorbiertem Licht I_A aus dem Lambert-Beerschen-Gesetz (Gl. (1.10)) in Abhängigkeit von der eingestrahlten Intensität I_0 an der Oberfläche des Gewebes, dem Absorptionskoeffizienten α , der Farbstoffkonzentration c im Gewebe und der Probendicke d gemäß

$$I_A = I_0 (1 - e^{-\alpha c d}). \quad (3.2)$$

Durch Einsetzen von Gl. (3.2) in (3.1) und Ersetzen von I_F/I_0 durch das Symbol F (relative Fluoreszenz) erhält man die Beziehung

$$F = \gamma \phi_F (1 - e^{-\alpha c d}), \quad (3.3)$$

deren Verlauf in nebenstehender Abbildung dargestellt ist.



Für kleine Konzentrationen kann Gl. (3.3) gut durch $F \approx \gamma \phi_F \alpha c d$ angenähert werden (gestrichelte Linie). Die beobachtete Fluoreszenz ist dann proportional zur Konzentration des Fluorophors. Auf Grundlage dieser Näherung wird bisher in vielen Untersuchungen von der gemessenen Fluoreszenzintensität auf die Farbstoffkonzentration geschlossen [MJ94, FVB96, RRK97]!

Mit steigender Konzentration ist aber eine zunehmende Abweichung vom linearen Zusammenhang $F \sim c$ zu erwarten. Dafür sind mehrere Effekte verantwortlich: Zum einen kommt es mit wachsender Konzentration zur Bildung von Dimeren und größeren Aggregaten, die in der Regel eine geringere Quantenausbeute als ihre Monomere besitzen und meist eine rot-verschobene Absorption aufweisen. Zum anderen bewirkt ein Anstieg der Konzentration eine Abnahme der Eindringtiefe für das Anregungslicht, da die Absorption im Gewebe zunimmt. Dieses als *Inner-cell-Effekt* bezeichnete Phänomen ist anschaulich in Abb. 3.1 dargestellt.

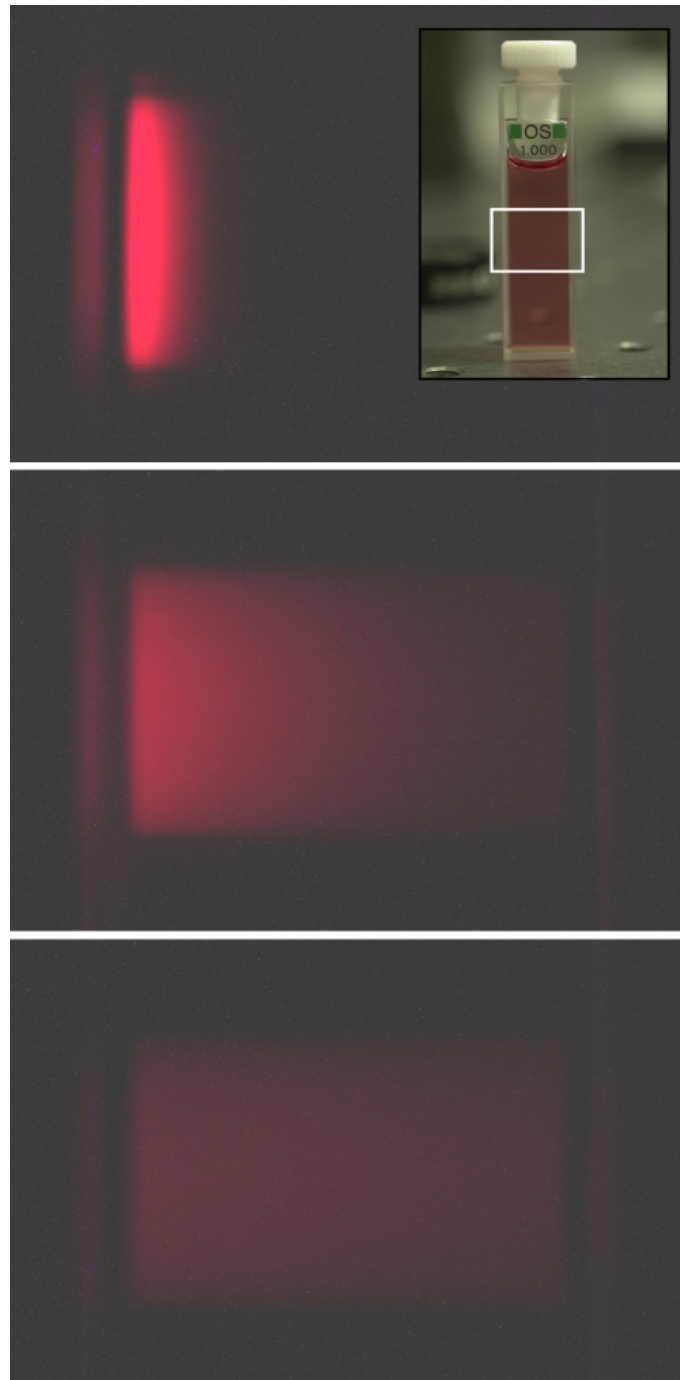


Abbildung 3.1: *Inner-cell-Effekt bei Bestrahlung einer Farbstofflösung mit Licht. Durch die höhere Absorption des Farbstoffes (Rhodamin 6G/Methanol) bei hohen Konzentrationen (oben) ist die Eindringtiefe des Anregungslichts und damit die Tiefe des Fluoreszenzlichts im Vergleich zu mittleren (mitte) und niedrigen Konzentrationen (unten) deutlich geringer.*

Um die Größenordnung der Abweichung vom linearen Zusammenhang abschätzen zu können, kann man die Differenz ΔF aus Näherung und exakter Formel (3.3) bilden und den relativen Fehler berechnen mit

$$\frac{\Delta F}{F} = \frac{\alpha c d}{1 - e^{-\alpha c d}} - 1. \quad (3.4)$$

Eine relative Abweichung $\Delta F/F$ von 10 % wird erreicht, wenn für das Produkt $\alpha c d \approx 0,2$ gilt.

Geht man im Falle von PpIX davon aus, dass der Farbstoff nach topischer Applikation von 5-ALA homogen in der Epidermis ($d = 0,1 \text{ mm}$) verteilt ist [SSL94] und an der Soret-Bande angeregt wird ($\alpha = 3,8 \times 10^5 \text{ Liter mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, Abb. 2.21), ergibt sich daraus eine Konzentration von $c = 5 \times 10^{-5} \text{ mol/Liter}$. Wird der Farbstoff nicht an der Soret-Bande, sondern an einer der Q-Banden angeregt, dann ist der Fehler, den man bei der Interpretation der gemessenen Fluoreszenzintensitäten macht, etwa um den Faktor 10–20 kleiner (da der Absorptionskoeffizient an den Q-Banden entsprechend kleiner ist) bzw. die kritische Konzentration um diesen Faktor höher. Zudem führt eine langwelligere Anregung zu größeren Eindringtiefen des Anregungslichts in das Gewebe: unter Anregung bei 630 nm (letzte Q-Bande) ist die Eindringtiefe etwa 1,4 mal größer als bei 400 nm (vgl. Abb. 1.19). Die langwelligere Anregung ist aber auch mit einer entsprechend niedrigeren Fluoreszenzintensität verbunden, da weniger Licht vom Farbstoff absorbiert wird.

Nach topischer Gabe von 5-ALA wurde in Basalzellkarzinomen ein mittlerer Porphyringehalt von etwa 60 nmol/g Protein festgestellt [FLS99]. Nimmt man einem Gewichtsanteil von Proteinen am Gewebe von ca. 30 % an und setzt die Dichte des Gewebes gleich der von Wasser (1 g/cm^3), dann ergibt sich eine geschätzte, mittlere Porphyrinkonzentration im Gewebe von $2 \times 10^{-5} \text{ mol/Liter}$. Da Porphyrine aufgrund von physiologischen Bedingungen aber nicht gleichmäßig im Gewebe verteilt sein dürften und es deshalb zu lokalen Konzentrationsunterschieden kommen kann, kann die Abweichung vom linearen Zusammenhang $F \sim c$ bei ALA-induzierten Porphyrinen auch deutlich mehr als 10 % betragen.

Nach intravenöser Gabe von ICG mit der Dosierung 0,5 mg/kg Körpergewicht und einem mittleren Plasmavolumen von 42 ml/kg Körpergewicht ergibt sich eine anfängliche ICG-Konzentration im Blut von 11,9 mg/Liter oder $1,5 \times 10^{-5} \text{ mol/Liter}$. Wird ICG am Absorptionsmaximum angeregt ($\alpha = 6,3 \times 10^5 \text{ Liter mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, Abb. 2.11) und geht man von einem mittleren Gefäßdurchmesser von $20 \mu\text{m}$ aus [Fri98], dann hat das Produkt $\alpha c d$ einen Wert von etwa 0,02. Dafür beträgt die Abweichung $\Delta F/F$

rund 1 %. Bei einer 4-fach höheren Dosierung (2 mg ICG/kg Körpergewicht) und einem mittleren Gefäßdurchmesser von $50 \mu\text{m}$ beträgt die Abweichung vom linearen Zusammenhang etwa 10 %. Da beim Menschen die anfängliche ICG-Konzentration in nur 3 Minuten etwa auf die Hälfte abfällt [PPK70], wird auch der Fehler, den man bei der Abschätzung der Konzentration durch Messung der Fluoreszenzintensität macht, sehr schnell kleiner.

3.2.3 Reabsorption und Reemission

Wenn sich Absorptions- und Emissionsspektrum überlappen, wird ein Teil der Fluoreszenzphotonen von den Farbstoffmolekülen reabsorbiert, wodurch erneut Fluoreszenzquanten emittiert werden können. Formal kann die Reabsorption und Reemission den optischen Eigenschaften des Gewebes $\gamma(\lambda)$ zugeschrieben werden. Die von den Farbstoffmolekülen abgestrahlte Fluoreszenzintensität (proportional zu $I_A \phi_F$) wird durch Reabsorption und Reemission um den Faktor $f_{AE}(\lambda)$ geschwächt (vgl. Anhang C) und an der Gewebeoberfläche zu einem Anteil $R_F = (n-1)^2/(n+1)^2$ (n ist der Brechungsindex des Gewebes) reflektiert:

$$\gamma(\lambda) = (1 - R_F) f_{AE} \xi(\lambda) \quad (3.5)$$

Der Faktor $\xi(\lambda)$ beinhaltet Einflüsse, die durch die Detektionsgeometrie und die spektrale Empfindlichkeit des Detektors verursacht werden. Schränkt man die Bedingungen erneut auf die Verhältnisse wie in einer Farbstofflösung ein (keine Absorption und Streuung durch das Medium), ergibt sich für reine Reabsorption f_A der Ausdruck [PL87]

$$f_A(\lambda) = \frac{\sigma_L}{\sigma_L + \sigma(\lambda)} \frac{1 - T_L^{[\sigma_L + \sigma(\lambda)]/\sigma_L}}{1 - T_L} . \quad (3.6)$$

Dabei ist σ_L der Absorptionsquerschnitt bei der Anregungswellenlänge und σ der Absorptionsquerschnitt bei der Wellenlänge λ . $T_L = \exp(-\sigma_L c d N_A)$ ist die Transmission des Anregungslichts durch das Gewebe.

Trägt man für PpIX den Reabsorptionsfaktor f_A in Abhängigkeit von der Wellenlänge für verschiedene Farbstoffkonzentrationen auf (Abb. 3.2), so stellt man fest, dass die Reabsorption nur im Bereich der Soret-Bande von Bedeutung ist. Da Porphyrine ihr Emissionsmaximum aber um 630 nm haben, nimmt die Reabsorption von Fluoreszenzlicht und damit auch die Reemission praktisch keinen Einfluss auf die Fluoreszenzintensität.

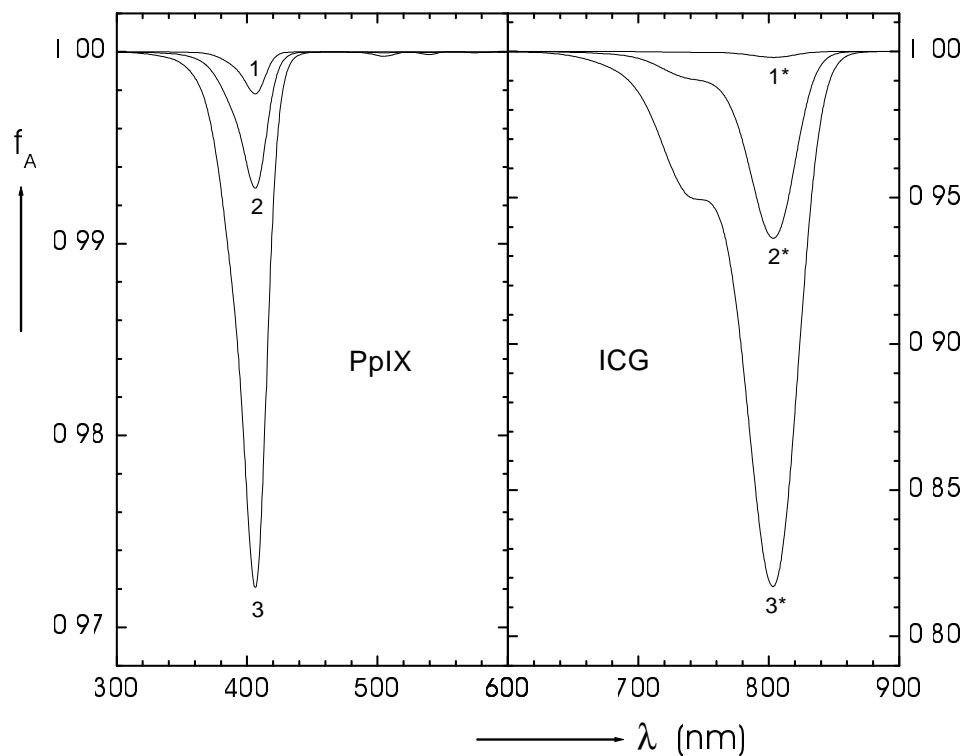


Abbildung 3.2: Reabsorption von Fluoreszenzlicht in Abhängigkeit von der Wellenlänge für verschiedene Farbstoffkonzentrationen. **Links** PpIX in DMSO (mol/Liter): (1) $7,6 \times 10^{-7}$; (2) $3,8 \times 10^{-6}$; (3) $1,5 \times 10^{-5}$. **Rechts** Indocyaningrün in Blutplasma (mol/Liter): (1*) $1,6 \times 10^{-6}$; (2*) $5,8 \times 10^{-5}$; (3*) $2,3 \times 10^{-4}$ (Erklärungen siehe Text). Man beachte die unterschiedlichen Skalen für f_A !

Für Indocyaningrün überlappen sich Absorptions- und Emissionsspektrum sehr stark (vgl. Abb. 2.18). Nach intravenöser Gabe werden anfängliche Konzentrationen von $(1,5\text{--}6) \times 10^{-5}$ mol/Liter erreicht (s. o.). Die zu erwartende Reabsorption $1 - f_A$ beträgt dafür am Absorptionsmaximum etwa 5–6 %, fällt aber bei 835 nm (Emissionsmaximum) bereits wieder auf 1–2 % ab.

Findet nach Reabsorption auch Reemission statt, muss Gl. (3.6) erweitert werden, sodass für f_{AE} gilt [BP90]:

$$f_{AE}(\lambda) = f_A(\lambda) / \{1 - [1 - f_A(\lambda)]\phi_F\} \quad (3.7)$$

Für ICG in Blutplasma ergibt sich daraus eine Erhöhung der Fluoreszenzintensität durch Reemission um etwa 0,6 %. Die Steigerung der Fluoreszenzintensität durch Reemission ist also ca. um den Faktor 10 kleiner als die Schwächung durch Reabsorption.

3.3 Fluoreszenzmessungen am Tiermodell mit ICG

Da die Absorption von endogenen Chromophoren und die Streuung im Gewebe mit zunehmender Wellenlänge abnehmen, sollten zur FD Farbstoffe eingesetzt werden, die ihre maximalen Absorptions- und Emissionsbanden im nahen IR besitzen. Ein solcher Farbstoff ist ICG ($\sigma_{\text{abs}}^{\text{max}} \approx 805$ nm, $\sigma_{\text{em}}^{\text{max}} \approx 835$ nm in humanem Blutplasma, abhängig von der Konzentration). Die Visualisierung des Farbstoffes ist wegen den sich überlappenden Absorptions- und Emissionsspektren und der geringen Leistung, die Lichtquellen im nahen IR aufweisen, mit technischen Schwierigkeiten verbunden.

3.3.1 Tumormodell

Zur Untersuchung der spektralen Eigenschaften von ICG *in vivo* diene das amelanotische Melanom des Hamsters. Dazu wurde männlichen Syrischen Goldhamster mit einem Gewicht von 60–80 g eine Kammer aus Titan in eine dorsale Hautfalte präpariert und fixiert [EAG80]. Zwei Tage nach Präparation wurden in Kammern, die ohne erkennbare Anzeichen einer Entzündung oder Einblutung waren, ca. 2×10^5 amelanotische Melanomzellen (A-Mel-3) in Suspension implantiert [AEG81]. Während den Präparationen wurden die Tiere mit Ketamin und Xylazin (100 mg/kg und 8 mg/kg Körpergewicht, intraperitoneal⁵) anästhesiert. Um die Angehrate der Tumoren zu erhöhen, wurden die Tiere die folgenden vier Tage bei 32° C gehalten.

⁵durch die Bauchdecke injiziert

Durch die beschriebene Präparation bildet sich nach etwa 5–6 Tagen ein abgegrenzter, flacher Tumor mit 4–6 mm Durchmesser und 1–2 mm Dicke innerhalb von gesundem Gewebe, bestehend aus Hautmuskel, Fettgewebe und Dermis [EAG80]. Insgesamt ist die Kammer transparent, sodass die innerhalb liegenden und freipräparierten Gefäße auch im Durchlicht beobachtet werden können.

3.3.2 Intravitale Fluoreszenzmikroskopie

Mithilfe der intravitale Fluoreszenzmikroskopie ist es möglich, das Verhalten von Fluoreszenzfarbstoffen oder fluoreszenzmarkierten Objekten (z. B. mit Fluoresceiniso-thiocyanat (FITC) markierte Erythrozyten zur Bestimmung der Blutfließgeschwindigkeit [ZPP83]) an lebenden, unnarkotisierten Tieren über längere Zeit (mehrere Stunden; an verschiedenen Tagen) unter normalen, physiologischen Bedingungen zu beobachten.

Das verwendete Fluoreszenzmikroskop (Axioplan, Carl Zeiss GmbH, Jena) bestand aus einem Tubus, an dessen hinterem Eingang eine Lichtquelle adaptiert war (Abb. 3.3). Zur Anregung der Fluoreszenz diente eine stufenlos regulierbare 100 W Halogenlampe, die durch einen Neutralglasfilter (NG-Filter) zusätzlich abgeschwächt werden konnte. Nach Durchlaufen des Mikroskoptubus wurde aus dem weißen Spektrum der Lichtquelle mittels eines Bandpassfilters (Filter λ_{ex}) ein kleiner Wellenlängenbereich diskriminiert, der von einem Langpassfilter (dichroider Teilerspiegel) rechtwinklig auf das Objektiv reflektiert wurde (Filtercharakteristiken s. Abb. 3.4). Vom Objektiv wurde der Lichtstrahl fokussiert und beleuchtete die Rückenkammer des Hamsters. Während der Untersuchung wurde der Hamster in einer Plexiglasröhre, die auf dem Mikroskopisch montiert war, immobilisiert. Die Rückenkammer selbst befand sich außerhalb der Röhre und wurde senkrecht zum Strahlengang unterhalb des Objektives fixiert.

Das emittierte Fluoreszenzlicht wurde vom Objektiv gesammelt und auf den dichroiden Teilerspiegel gebracht. Dieser war für Wellenlängen > 810 nm durchlässig, sodass der größte Anteil des Fluoreszenzlichts transmittiert wurde; rückgestreutes Anregungslicht wurde reflektiert. Da die Trennung von Anregungs- und Fluoreszenzlicht nicht vollständig geschah (s. Abb. 3.4), war dem Teilerspiegel ein Bandpassfilter (Filter λ_{em}) nachgeschaltet. Das transmittierte Fluoreszenzlicht wurde von einer intensivierten 8-Bit-s/w-CCD-Kamera (HG16, PCO, Kelheim), die über eine Framegrabber-Karte an einen PC angeschlossen war, mit einer Auflösung von 768×572 Pixel detektiert.

Durch eine weitere Lichtquelle, an der ein Lichtleiter mit Kondensorlinse angeschlossen war, konnte die Kammer von unten beleuchtet werden, sodass bei Entfernen des Teilerspiegels und Emissionsfilters (Filter λ_{em}) Durchlichtaufnahmen möglich waren.

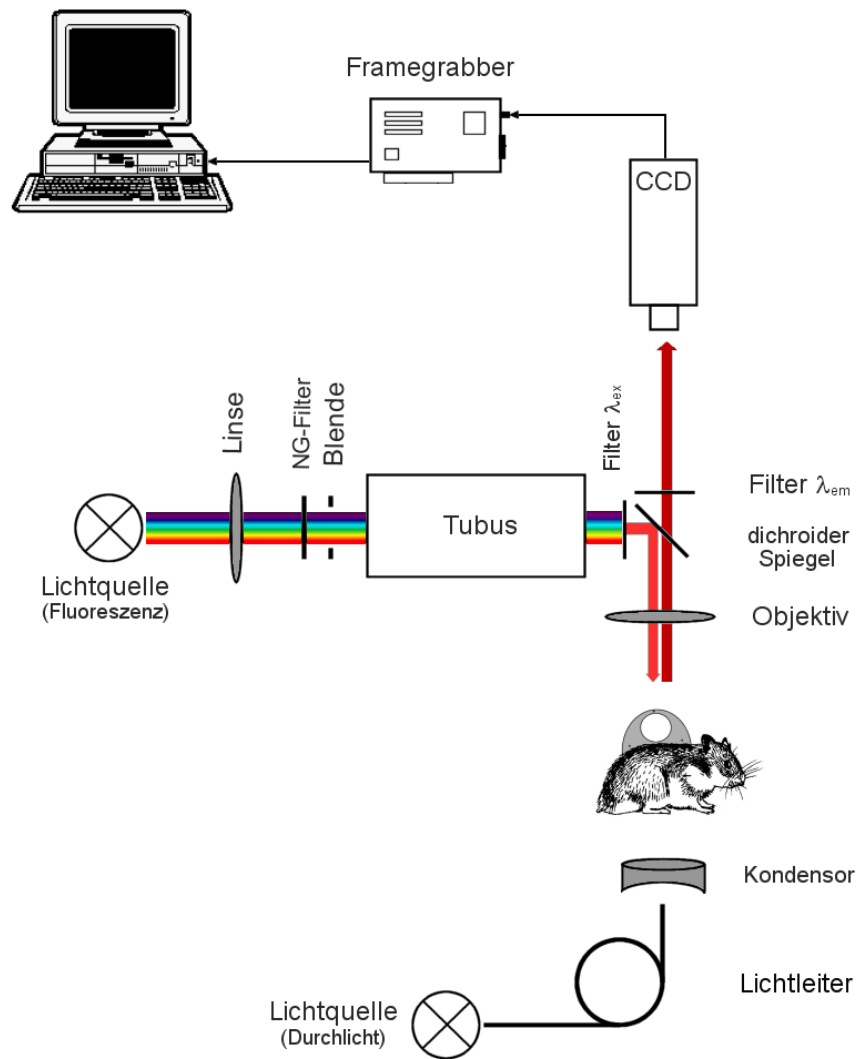


Abbildung 3.3: Schematische Darstellung der intravitalen Fluoreszenzmikroskopie.

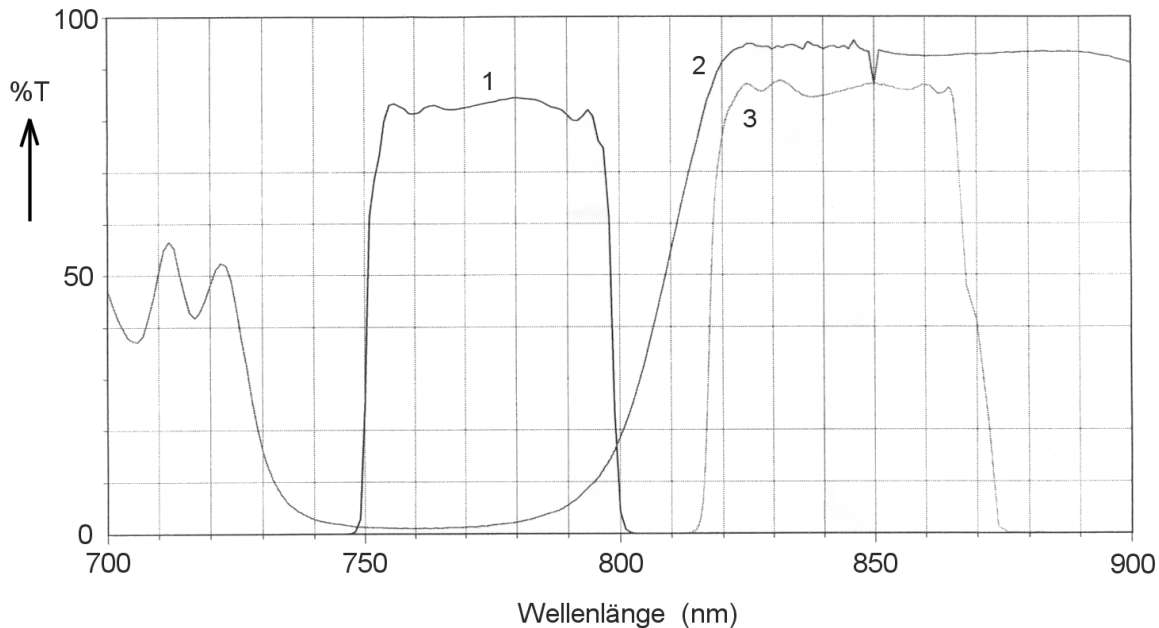


Abbildung 3.4: Transmissionskurven der Filter im Fluoreszenzmikroskop: (1) Filter λ_{ex} (HQ775/50x)[†]; (2) Dichroider Teilerspiegel (Q810LP)[†]; (3) Filter λ_{em} (HQ845/55m)[†]; [†] AF Analysentechnik, Tübingen.

3.3.3 Probleme bei der Visualisierung von ICG

Zur Trennung von Anregungs- und Emissionslicht wären Kantenfilter in Form einer Rechteckfunktion ideal; dies wird in der Praxis jedoch nicht erreicht (s. Abb. 3.4, Kurve 2). Die Wellenlängendifferenz zwischen Sperr- und Durchlassbereich liegt in der Regel bei 20–30 nm, sodass Anregungs- (λ_{ex}) und Detektionswellenlängen (λ_{em}) weiter von einander entfernt gewählt werden müssen als notwendig. Damit ist aber eine geringere Ausbeute an Fluoreszenzlicht verbunden, da der Farbstoff außerhalb des Absorptionsmaximums weniger absorbiert und deshalb entsprechend weniger stark emittiert. Zudem wird im Sperrbereich nicht Transmission $T = 0\%$ und im Durchlassbereich $T = 100\%$ erreicht, sodass Anregungs- und Emissionslicht nicht vollständig getrennt werden können; der Kontrast in den Fluoreszenzbildern nimmt ab.

In vivo werden nach intravenöser Gabe von 2 mg ICG/kg Körpergewicht Konzentrationen von $(1,5\text{--}6) \times 10^{-5}$ mol/Liter erreicht (s. Abschnitt 3.2.2). Dies bewirkt eine Herabsetzung der Fluoreszenzquantenausbeute von 9,4% (Monomere) auf 3–5% je nach Konzentration (s. Abb. 2.15). Pro 100 eingestrahlte Anregungsphotonen, die ein Farbstoffmolekül absorbiert, werden im Mittel also nur etwa drei bis fünf wieder als Fluoreszenzquanten emittiert; diese können in ein bis zwei Fällen von anderen Molekülen

reabsorbiert werden (s. Abschnitt 3.2.2) und von endogenen Chromophoren im Gewebe absorbiert und gestreut werden (Transmission bei 800 nm etwa 0,65; Abb. 1.15). Letztendlich treffen pro 100 eingestrahlte Photonen also etwa 2–3 Photonen auf den Detektor.

Üblicherweise werden zur orts aufgelösten Fluoreszenzmessung CCD-Kameras als Detektoren verwendet. Deren spektrale Empfindlichkeit hat das Maximum um 500 nm und fällt mit zunehmender Wellenlänge schnell ab. Selbst speziell für den Einsatz im nahen IR gefertigte Kameras weisen bei 800 nm nur mehr etwa ein Drittel der Empfindlichkeit am Maximum auf. Bei schwierigen Lichtverhältnissen können intensivierte CCD-Kameras eingesetzt werden. Diese bieten zur Verstärkung des Messsignals die Möglichkeit zur Integration über die Zeit und die Detektorfläche (sog. Binning). Beim elektronischen⁶ Binning werden beim zyklischen Auslesen der Photodioden auf dem CCD-Sensor benachbarte Zellen zusammengefasst, wobei das Signal verdoppelt (2×1-Binning), vervierfacht (2×2-Binning) usw. wird, das Rauschen des Detektors (thermische Elektronen) aber gleich bleibt. Die Verstärkung des Signals durch Binning geht jedoch zu Lasten der Auflösung, die sich dadurch halbiert, viertelt, usw. Bei der Integration über die Zeit werden die eintreffenden Photonen auf dem Detektor „gesammelt“, indem die Zellen des CCD-Sensors in längeren Zeitabständen ausgelesen werden. Die Folge davon ist eine Herabsetzung der Bildfrequenz (Stroboskop-Effekt), wodurch keine Echtzeitbeobachtung mehr möglich ist. Während der Integration muss das beobachtete Objekt ruhig bleiben, da die Bilder sonst unscharf werden. Gerade der letzte Punkt ist bei *in vivo*-Messungen nicht immer zu erfüllen, da die notwendigen Integrationszeiten im Bereich 1–10 s liegen und eine vollständige Immobilisierung des Objekts in dieser Zeit oft nicht möglich ist (Atembewegungen, Pulsieren von Gefäßen).

Inkohärente Lichtquellen (Halogen-, Quecksilberdampf-, Xenon-, Metalldampflampen) haben im nahen IR nur mehr geringe Intensität, weshalb zur Anregung von ICG oft Diodenlaser verwendet werden. Auch diese sind im Bereich $\lambda = 750\text{--}805\text{ nm}$ nur mehr mit begrenzter Ausgangsleistung erhältlich [www.laser2000.de].

3.3.4 Abklingverhalten von ICG *in vivo*

Im Gegensatz zu *in vitro*-Untersuchungen kann sich die Konzentration eines Farbstoffes *in vivo* sehr schnell ändern. Da die Absorption sowie die Fluoreszenzlöschung und Reabsorption eines Farbstoffes von seiner Konzentration abhängen, muss zur Charakterisierung dieser Effekte die zeitliche Entwicklung der Konzentration untersucht werden.

⁶im Gegensatz zum digitalen Binning in der Bildverarbeitung, bei dem benachbarte Pixel per Software zusammengefasst werden [Rus95].

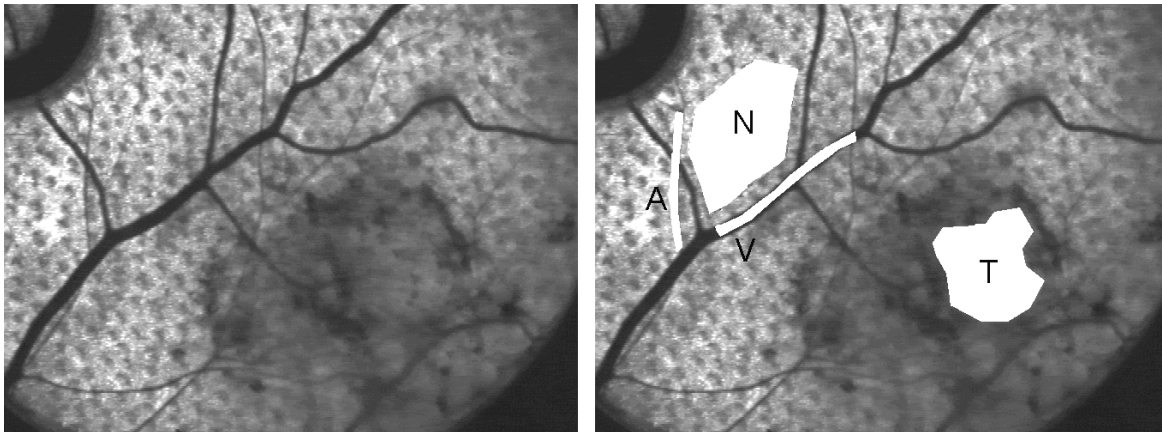


Abbildung 3.5: Rückenhautkammer des Hamster mit implantiertem A-Mel-3-Tumor (dunkler Bereich, unten rechts). **Links** Durchlichtbild; **Rechts** Festlegung von Areas zur Bestimmung der Abklingverhaltens: (A) Arterie, (V) Vene, (T) Tumor, (N) Normalgewebe.

Da ICG ausschließlich durch die Leber eliminiert wird [Ott98], kann von der Abklingzeit des Farbstoffes auf die Leberfunktion geschlossen werden [LSL67, LLH79, GSN84].

Material und Methoden

Zur Untersuchung des Abklingverhaltens wurde den Tieren am Tag 6 nach Tumorimplantation 2 mg/kg Körpergewicht ICG-NaI (ICG-Pulsion, Pulsion, München) über einen arteriellen Katheter in Form einer Bolusinjektion verabreicht. Dies entsprach bei einem 80 g schweren Hamster einem Volumen von 0,2 ml aus einer 20 mmol/Liter Stammlösung von ICG-NaI in physiologischer Kochsalzlösung (Blutvolumen des Hamsters etwa 8 ml). Vor (Hintergrundbild) und nach Injektion wurden mit dem in Abschnitt 3.3.2 beschriebenen Aufbau in festgelegten Zeitabständen Fluoreszenzbilder der Kammer aufgenommen (Integrationszeit der Kamera 2,5 s). Zwischen den Messungen wurde die Lichtquelle zur Anregung der Fluoreszenz abgeblendet, um das Ausbleichen des Farbstoffes zu vermeiden. Zur Auswertung der Bilder wurde nach Subtraktion des Hintergrundbildes die mittlere Helligkeit in zuvor festgelegten Regionen ermittelt (Abb. 3.5). Die Auswertung selbst erfolgte mit selbstgeschriebenen Algorithmen auf Basis der Programmiersprache IDL (Creaso, Gilching).

Alternativ wurde in einer weiteren Versuchsreihe die Konzentration von ICG im Blutplasma durch spektroskopische Messung bestimmt. Dazu wurde den Tieren über einen arteriellen Katheter wie oben beschrieben ICG-NaI injiziert und zu definierten Zeit-

punkten je 100 μl über einen venösen Katheter entnommen. Um eine Gerinnung des Blutes zu vermeiden, wurde den Proben 10 μl Heparin zugegeben (der Fehler von 10 % in der Konzentration, der sich daraus ergab, wurde bei der Auswertung korrigiert). Vor Injektion wurde den Tieren eine Probe ohne ICG entnommen (Kontrolle) und der Hämatokrit des Blutes bestimmt. Anschließend wurden die Proben zentrifugiert (10 min bei 2000 min^{-1}) und die Absorption bei 800 nm im Überstand der Proben mit einem Spektrophotometer gemessen. Zur Umrechnung der ermittelten Absorption in die Konzentration, die der Farbstoff zu diesem Zeitpunkt hatte, wurde eine Verdünnungsreihe von ICG-NaI in Hamsterplasma mit definierten Konzentrationen hergestellt und unter identischen Bedingungen vermessen (Standardkurve).

Ergebnisse

Abb. 3.6 zeigt eine Bildreihe, die das Anfluten und Abklingen von ICG in der Hamsterkammer darstellt. Da der Farbstoff arteriell verabreicht wurde, werden beim Anfluten zuerst die Arteriolen dargestellt (Abb. 3.6 **B**). Auch im Bereich des Tumors war eine höhere Fluoreszenz als im übrigen Gewebe zu beobachten. Während des Anflutens stieg die Fluoreszenz rasch an und erreichte nach 1–5 min das Maximum (Abb. 3.6 **E**). 60 min nach Injektion (Abb. 3.6 **H**) wies der gesamte Tumor eine höhere Fluoreszenzintensität auf als das umliegende Gewebe und war mit der Intensität der Gefäße vergleichbar. Durch die densitometrische Auswertung der ausgewählten Areale (s. Abb. 3.5) konnte der zeitliche Verlauf der Fluoreszenz quantifiziert werden (Abb. 3.7). Nach der sehr schnellen Anflutung nahm die Fluoreszenzintensität in den Arealen exponentiell ab. Für große Zeiten stellte sich ein Plateau ein, das für Vene u. Tumor bzw. Arterie u. Normalgewebe in etwa gleich war.

Der mittlere Hämatokrit der entnommenen Blutproben betrug 48 % und ist damit mit dem des Menschen vergleichbar. Zur Umrechnung der Absorptionswerte in die entsprechenden Konzentrationen wurden 3 Standardkurven von verschiedenen Blutproben erstellt (Abb. 3.8). Diese wiesen eine unerwartet große Abweichung auf, sodass über die drei Geradensteigungen gemittelt wurde. Zwischen der Absorption (Optische Dichte, D) und der Konzentration (C in 10^{-5} mol/Liter) von ICG in den Blutproben bestand die Beziehung $D = 0,01 + 0,06 C$. Abb. 3.9 zeigt den direkten Vergleich von spektroskopischer und fluorometrischer Bestimmung der venösen Abklingkinetik von ICG nach Injektion von 2 mg/kg Körpergewicht. Die fluorometrische Auswertung (Index FL) lieferte im Vergleich zur spektroskopischen Bestimmung (Index SP) eine deutlich langsamere und biexponentielle Elimination von ICG aus dem Blut. Für die beiden Zeitpunkte 45 min und 60 min war auch in der spektroskopisch bestimm-

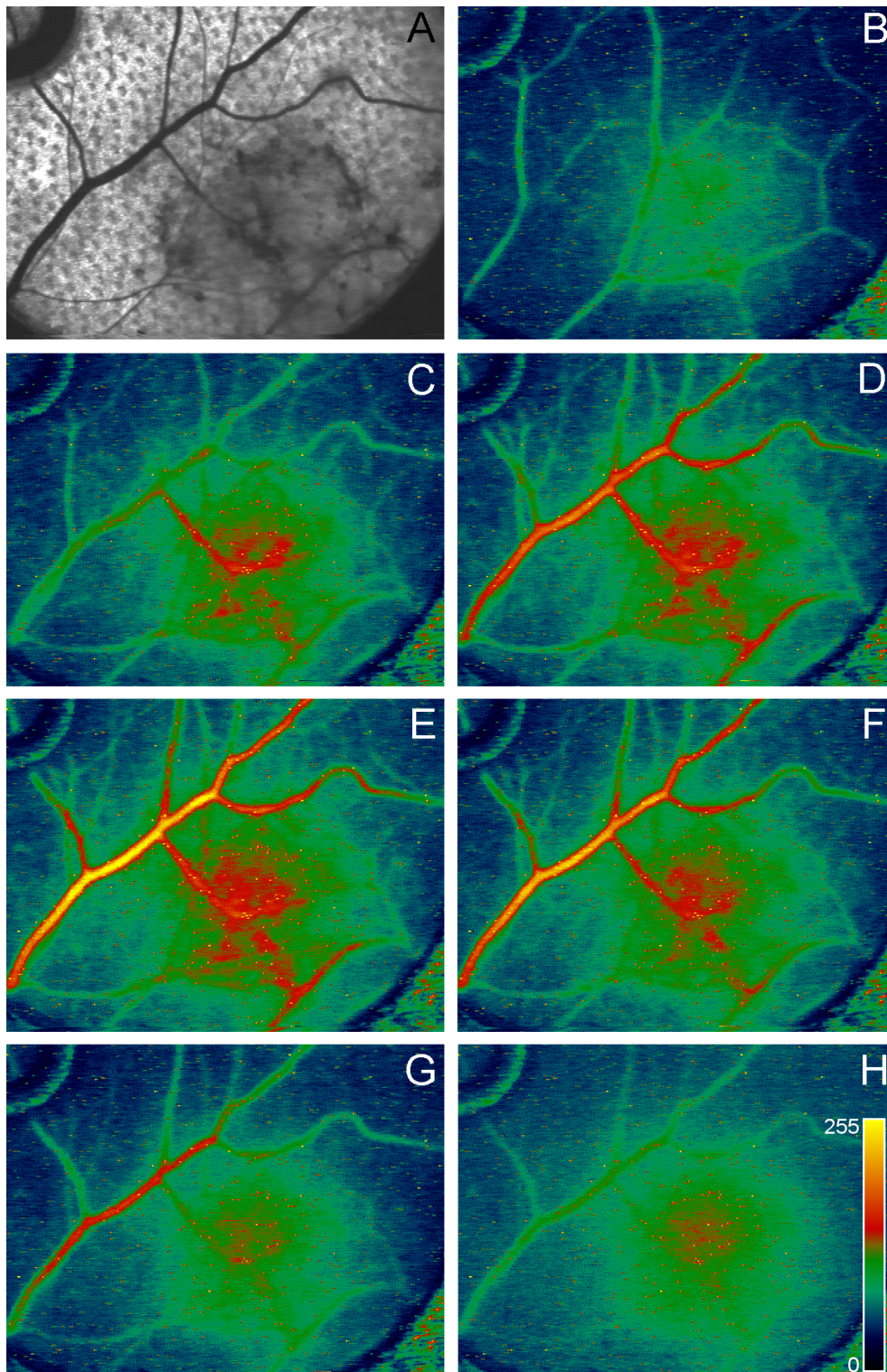


Abbildung 3.6: Fluoreszenz von ICG in der Hamsterkammer unter dem Fluoreszenzmikroskop zu verschiedenen Zeitpunkten nach Injektion. **A** Durchlichtbild; **B** 10s; **C** 20s; **D** 30s; **E** 1 min; **F** 5 min; **G** 20 min; **H** 60 min.

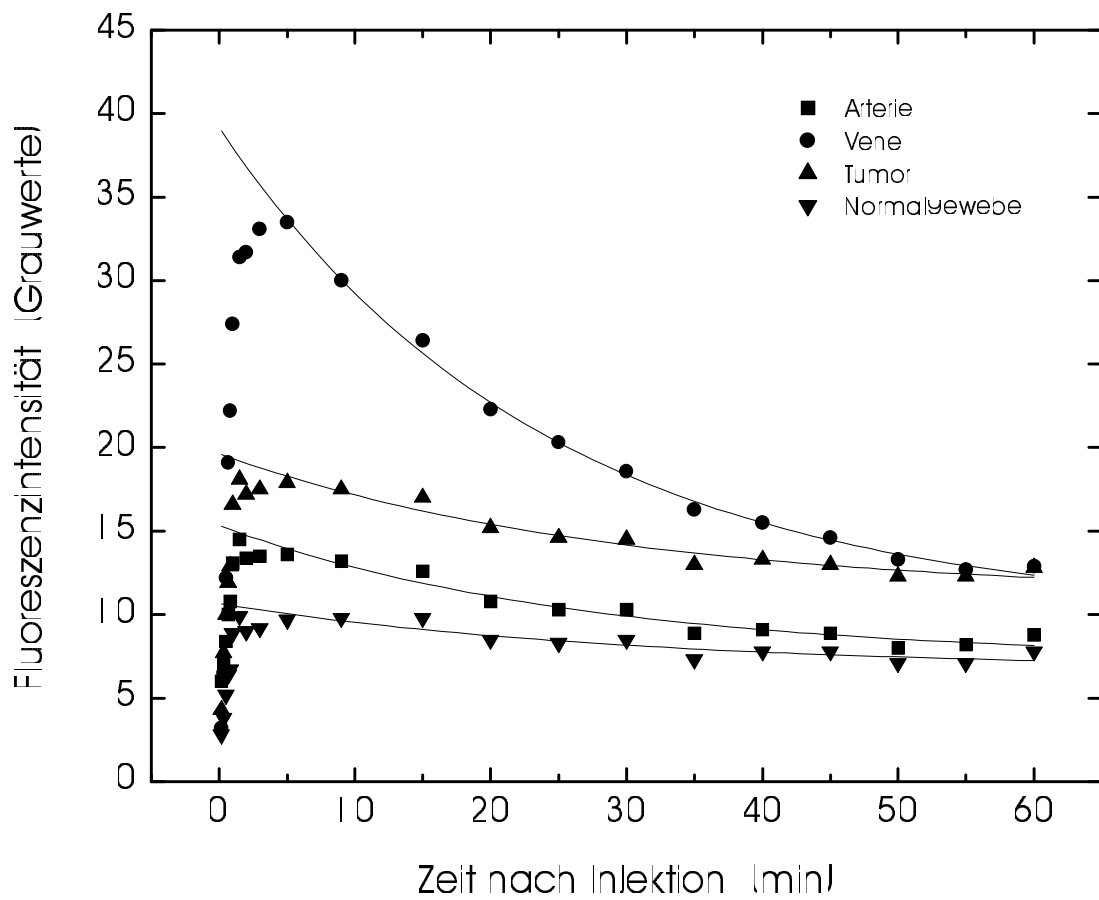


Abbildung 3.7: Zeitlicher Verlauf der Fluoreszenzintensität in zuvor ausgewählten Arealen (s. Abb. 3.5), gemittelt über $n = 8$ Tiere.

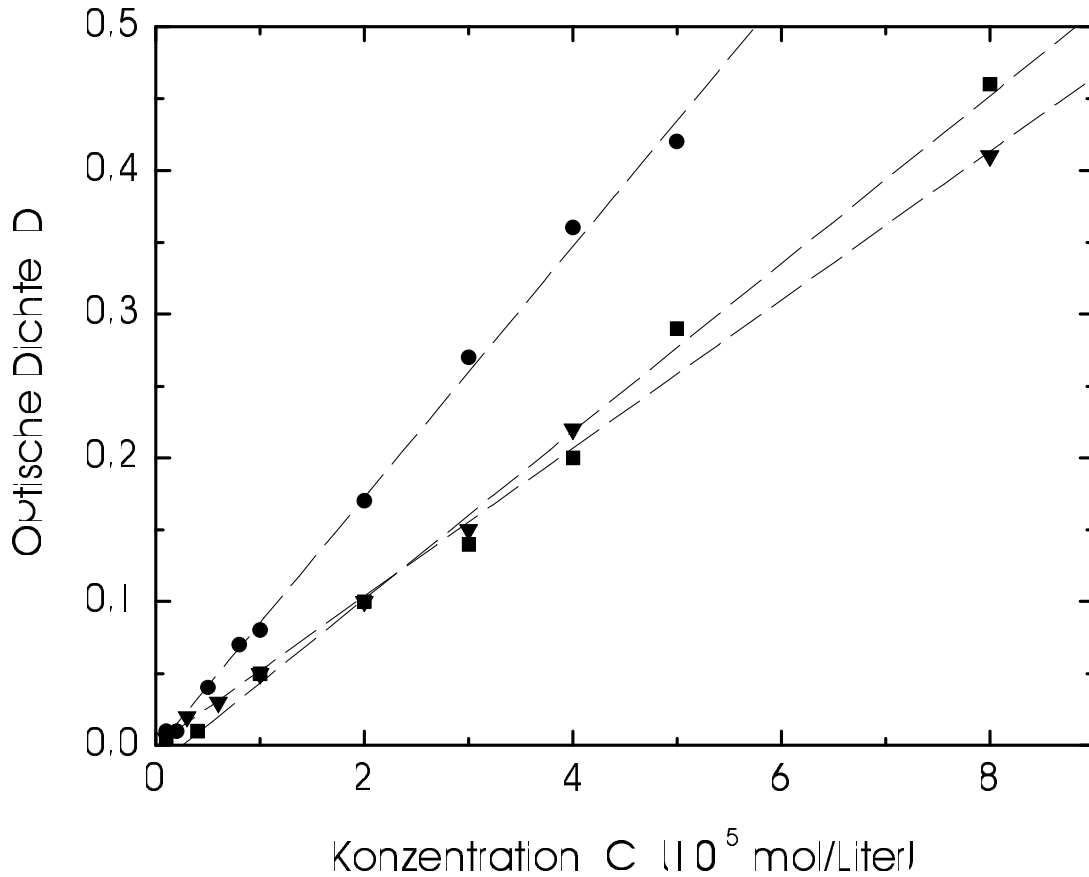


Abbildung 3.8: Standardkurven zur Umrechnung der Absorption einer Blutprobe in die entsprechende Konzentration ($n = 3$).

ten ICG-Konzentration eine Abweichung vom monoexponentiellen Abklingverhalten zu erkennen. Die venösen Abklingzeiten für die beiden Bestimmungsmethoden waren $\tau_1^{\text{FL}} = 41,3 \pm 1,3 \text{ min}$ und $\tau_2^{\text{FL}} = 91,8 \pm 11,7 \text{ min}$ bzw. $\tau^{\text{SP}} = 29,5 \pm 1,4 \text{ min}$. Zur Berechnung der Halbwertszeit $t_{1/2}$ gilt die Beziehung: $t_{1/2} = \tau \cdot \ln 2$.

Diskussion

Eine unterschiedlich starke Steigung von Standardkurven von ICG bei unterschiedlichen Blutproben wurde auch in anderen Untersuchungen beobachtet [HNH87] und durch die Komplexität der Wechselwirkung von ICG mit Proteinen erklärt. Standardkurven sollten deshalb immer mit dem Blut des gleichen Individuums erstellt werden, an dem auch die Untersuchungen durchgeführt werden. Bei der Eliminierung von ICG werden zwei Phasen beobachtet: zu Beginn tritt bis zur Sättigung der Kapazitäten eine

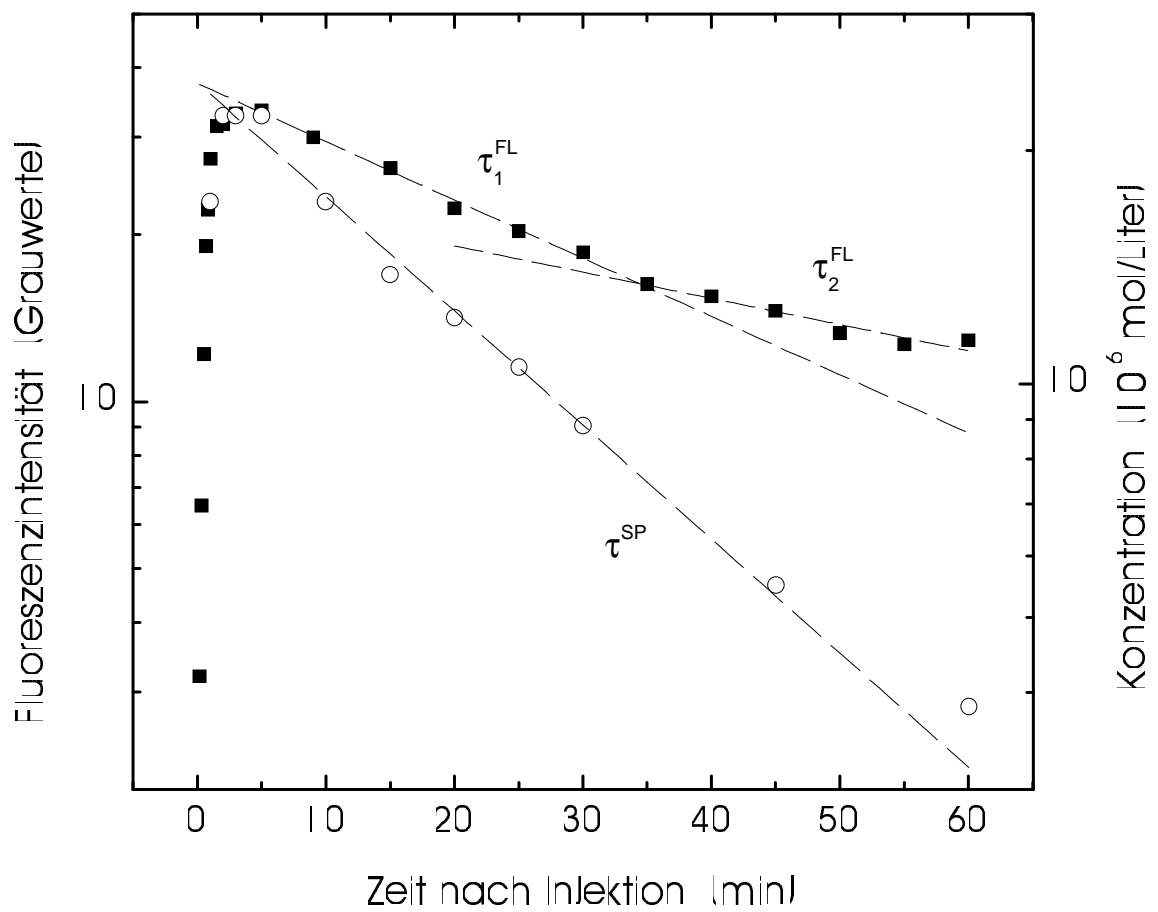


Abbildung 3.9: Fluorometrische (■; linke Achse; $n = 8$) und spektroskopische (○; rechte Achse; $n = 6$) Bestimmung der Abklingkinetik von ICG nach intravenöser Injektion von 2 mg/kg Körpergewicht.

schnellere Elimination ein als zu späteren Zeiten, wenn die beteiligten Transportmoleküle das ankommende ICG mit konstanter Rate zur Galle transportieren. Daraus resultiert eine biexponentielle Abklingkinetik mit zwei unterschiedlichen Abklingzeiten. Diese konnten bereits im Tierexperiment [TRE83, GTR00] und am Patienten [KSI85] nachgewiesen werden.

Der Unterschied in den Abklingzeiten zwischen fluorometrischer und spektroskopischer Bestimmung kann durch die Bindung von ICG an Endothelzellen der Gefäße und eine Extravasation von ICG in das Gewebe erklärt werden. Während mit der fluorometrischen Methode extravasiertes ICG erfasst werden kann, wird mit der spektroskopischen Methode nur das ICG, das sich im Blut befindet, detektiert.

Fluoreszenzspektroskopischer Nachweis von ICG *in vivo*

Zum spektroskopischen Nachweis von ICG wurde im Aufbau zur Messung der Fluoreszenzspektren (s. Abb. 2.7) anstelle der Probe P die transparente Rückenkammer eines Hamsters plziert. Nach Injektion von 2 mg/kg Körpergewicht ergaben sich die in Abb. 3.10 (oben) gezeigten Fluoreszenzspektren. Das Emissionsmaximum verschiebt sich während der Beobachtungszeit (mit abnehmender Konzentration) von 828 nm (1 min) nach 822 nm (60 min); die Fluoreszenzintensität (Fläche unter den Spektren) nimmt stetig ab. Nach Injektion von 15 mg/kg Körpergewicht (Abb. 3.10 (unten)) shiftet das Emissionsmaximum im gleichen Beobachtungszeitraum von 836 nm (1 min) nach 823 nm (60 min).

Die Verschiebung des Emissionsmaximums ist auf die Veränderung der Bindungsverhältnisse des ICG-Moleküls bzgl. der Proteine im Blut mit abnehmender Konzentration zurückzuführen. Vergleicht man die Ergebnisse mit den *in vitro*-Untersuchungen (s. Abb. 2.14), ergibt sich aus der Lage des Emissionsmaximums eine anfängliche Konzentration für ICG nach Injektion (1 min) von etwa 3×10^{-6} mol/Liter für die Dosis 2 mg/kg Körpergewicht bzw. $1,7 \times 10^{-5}$ mol/Liter für die Dosis 15 mg/kg Körpergewicht. Der aus den spektroskopischen Messungen ermittelte Wert nach Injektion von 2 mg/kg Körpergewicht beträgt hingegen $2,2 \times 10^{-5}$ mol/Liter, sodass zwischen beiden Messmethoden ein Faktor 10 Unterschied besteht. Dieser groß erscheinende Unterschied in der Konzentration wird aber durch einen Shift von nur etwa 9 nm verursacht (Abb. 3.11). Wegen der geringen Verschiebung des Emissionsmaximums bei kleinen Konzentrationen, ist die Ermittlung der Konzentration aus dem Emissionsspektrum mit großen Fehlern behaftet.

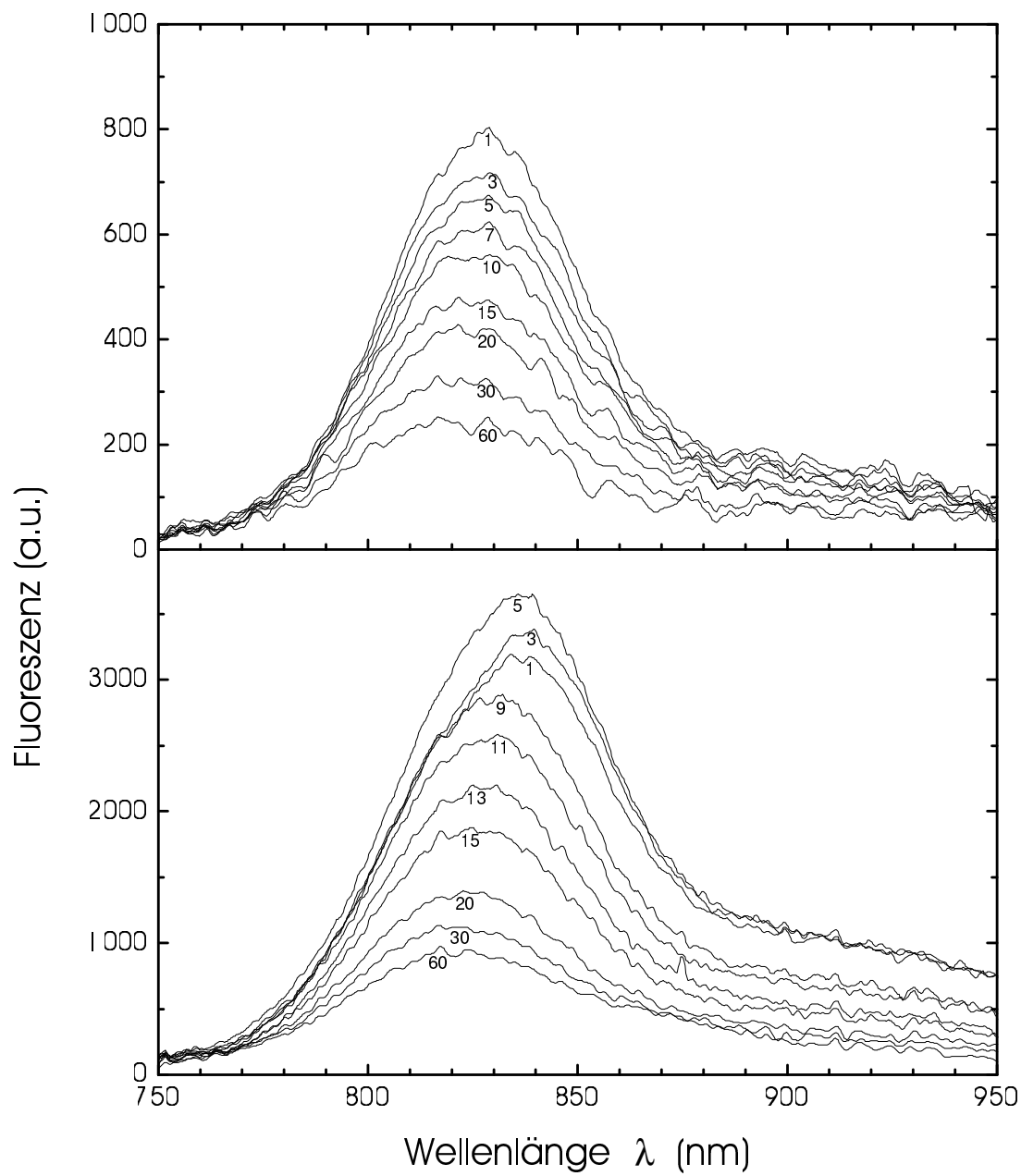


Abbildung 3.10: Fluoreszenzspektroskopischer Nachweis von ICG in vivo zu verschiedenen Zeitpunkten (min) nach Injektion. **Oben** 2 mg/kg Körpergewicht; **Unten** 15 mg/kg Körpergewicht.

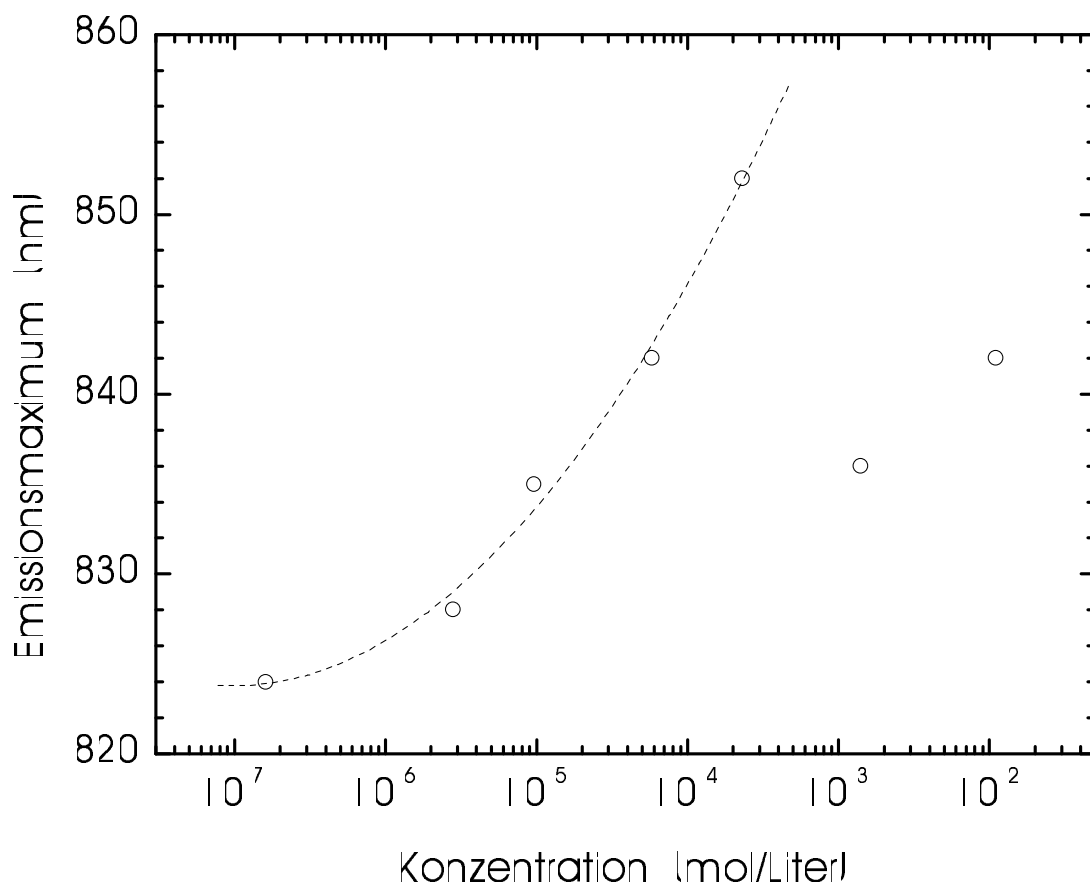


Abbildung 3.11: Lage des Emissionsmaximums von ICG-NaI in Hamsterplasma in vitro (s. Abb. 2.14).

3.4 5-ALA-induzierte Fluoreszenz in Tumoren der Haut

Bei den meisten fluoreszenzgestützten Untersuchungen der Haut werden als Farbstoff Porphyrine, die nach Gabe von 5-Aminolävulinsäure (ALA) im Rahmen der Hämbiosynthese entstehen, verwendet. Grund dafür ist die hohe Selektivität und Fluoreszenzquantenausbeute dieser Porphyrine und die topische Applizierbarkeit von 5-ALA. Hauptbestandteil der 5-ALA-induzierten Porphyrine ist Protoporphyrin IX (PpIX).

3.4.1 Hämbiosynthese

Die Hämbiosynthese verbindet den Tricarbonsäurezyklus mit der Atmungskette und ist essentiell, da das gebildete Häm als prosthetische Gruppe⁷ für Hämoglobin, Myoglobin und andere Oxidasen fungiert.⁸ Alle Schritte der Hämbiosynthese sind enzymkatalysiert und mit komplexen Adaptionsmechanismen ausgestattet [Bat93].

Die Hämbiosynthese ist kompartimentiert in Mitochondrium und Zytosol und besteht aus acht irreversiblen Schritten (Abb. 3.12). Im ersten Schritt kondensieren Succinyl-CoA und Glycin zu ALA. Die Reaktion wird katalysiert von der Aminolävulinsäure-Synthase und läuft im Mitochondrium ab. Das ALA-Molekül verläßt das Mitochondrium und gelangt ins Zytosol, wo aus zwei ALA-Molekülen ein farbloser Monopyrrolring, das Porphobilinogen (PBG), gebildet wird. Anschließend entsteht aus vier Molekülen PBG ein symmetrisches, lineares Tetrapyrrol, Hydroxymethylbilan (HMB). Diese Verbindung ist nur wenig stabil und kann, insbesondere in saurer Umgebung ohne Mitwirkung eines Enzyms zu den symmetrischen Porphyrinogenen Uroporphyrinogen I (URO'gen I) und Coproporphyrinogen I (COPRO'gen I) zerfallen. Unter physiologischen Bedingungen läuft jedoch eine Reaktion ab, bei der die Seitengruppen am D-Ring umgestellt werden und das Isomer Uroporphyrinogen III (URO'gen III) entsteht.⁹

In den nachfolgenden vier Decarboxylierungen entstehen Hepta-, Hexa-, Pentacarboxylporphyrinogen und schließlich Coproporphyrinogen III (COPRO'gen III). COPRO'gen III wird dann mithilfe der Coproporphyrinogen-Oxidase zu Protoporphyrinogen IX (PROTO'gen IX) umgeformt. Da dieses Enzym das COPRO'gen I nicht

⁷Als *prosthetische Gruppe* wird ein fest an ein Enzymprotein gebundenes Coenzym bezeichnet [Psc86].

⁸Ein Erwachsener produziert pro Tag etwa 7 μmol Häm/kg Körpergewicht, von denen 80–85 % für die Synthese von Hämoglobin verwendet werden.

⁹Im Normalfall wird weniger als 1 % HMB zur Bildung der Serie-I-Porphyrinogene, die nicht zu Häm metabolisiert werden können, umgebaut.

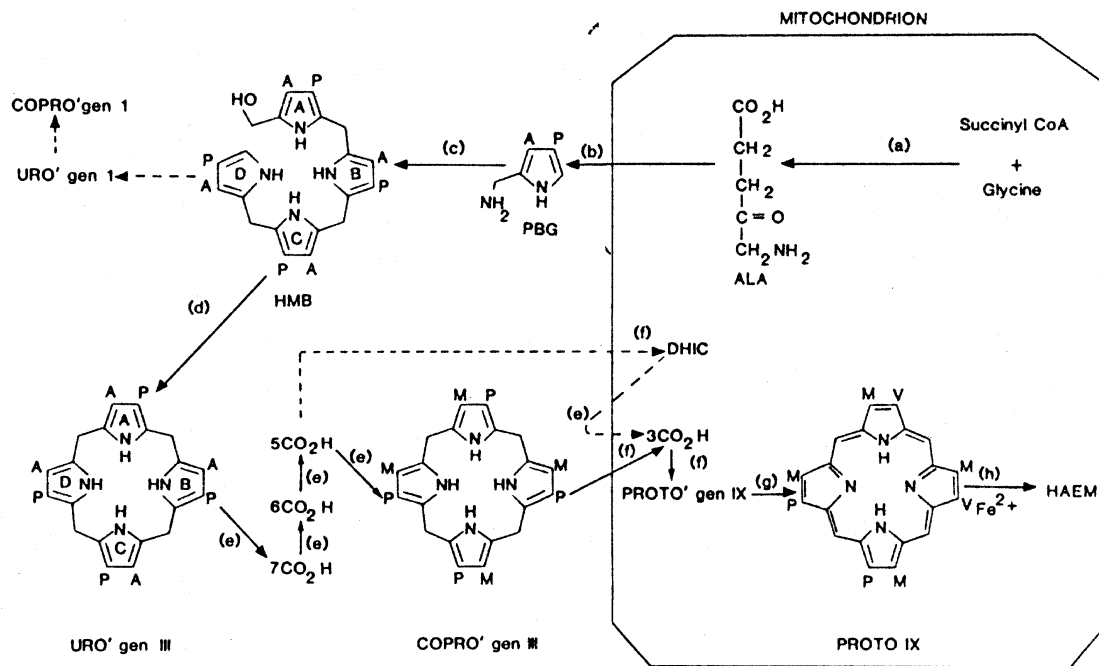


Abbildung 3.12: Hämbiosynthese [Eld94]. Substituenten an den Pyrrolringen sind A = CH₂COOH (Acetat); P = CH₂CH₂COOH (Propionat); M = CH₃ (Methyl); V = CH=CH₂ (Vinyl). Verwendete Abkürzungen sind ALA = Aminolävulinsäure; PBG = Porphobilinogen; HMB = Hydroxymethylbilan; DHIC = Dehydroisocoproporphyrinogen; URO'gen = Uroporphyrinogen; COPRO'gen = Coproporphyrinogen; PROTO'gen = Protoporphyrinogen; 3-, 5-, 6-, 7CO₂H = Tri-, Penta-, Hexa-, Heptacarboxyporphyrinogen. Die katalysierenden Enzyme sind ALA-Synthase (a), PBG-Synthase (b), PBG-Deaminase (c), Uroporphyrinogen-III-Synthase (d), Uroporphyrinogen-Decarboxylase (e), Coproporphyrinogen-Oxidase (f), Protoporphyrinogen-Oxidase (g) und Ferrochelata-se (h).

metabolisiert, wird der Syntheseweg an dieser Stelle isomerspezifisch. PROTO'gen IX wird anschliessend einer enzymatischen Aromatisierung unterzogen, aus der Protoporphyrin IX (PpIX) hervorgeht. Im letzten Schritt der Hämbiosynthese wird, katalysiert durch die Ferrochelatase, ein Fe^{2+} -Ion in das PpIX-Molekül eingebaut.¹⁰

3.4.2 Anhäufung von Porphyrinen nach exogener Gabe von 5-ALA

Unter physiologischen Bedingungen wird die ALA-Synthese durch die Hämkonzentration in der Zelle reguliert [KPP90]. Führt man 5-ALA exogen zu (oder liegt eine Stoffwechselstörung in der Hämbiosynthese vor (*Porphyrie*)), wird dieser Feedbackmechanismus umgangen indem das zugeführte ALA durch einen aktiven Transportmechanismus in die Zelle eingeschleust [RGH00] und wie körpereigenes ALA zu Porphyrinen verstoffwechselt wird. Da der geschwindigkeitsbestimmende Schritt der Hämbiosynthese, die ALA-Synthase, umgangen wurde, hängen die umgesetzten Raten nur mehr von den Enzymkapazitäten der jeweils folgenden Schritte ab. Es kommt zur Anhäufung von Porphobilinogen [Bat93] und Porphyrinen, insbesondere (80–90 %) PpIX [KP92, FAG97, FLS99]. Das gebildete PpIX akkumuliert vor allem an den Membranen der Mitochondrien [ML87], aber auch eine Umverteilung innerhalb der Zelle scheint möglich [Kes86].

Verbunden mit der Anhäufung von Porphyrinen ist eine Photosibilisierung der Haut [BN56]. 5-ALA selbst ist weder fluoreszierend noch photosensibilisierend. Die induzierten Porphyrine werden innerhalb von 24 Stunden wieder abgebaut [KP92, RSS97]. Neben der Sensibilisierung sind durch die exogene Gabe von 5-ALA keine Nebenwirkungen bekannt und es treten ohne Bestrahlung mit Licht erst bei sehr hohen Konzentrationen toxische Schäden auf [YVK93, RFK96].

3.4.3 Selektivität von 5-ALA-induzierten Porphyrinen

Im Gegensatz zu dem höhermolekularen HpD können kleine, hydrophile Moleküle wie ALA (Molekulargewicht 170 g/mol) auch topisch appliziert werden. ALA kann in einer Öl-in-Wasser-Emulsion sehr gut parakeratotisches Stratum corneum, das sich über den

¹⁰Zum Abbau von URO'gen III durch Decarboxylierung gibt es eine Alternative, bei der nicht COPRO'gen III, sondern Dehydroisocoproprophyrinogen (DHIC) entsteht. Dieser Weg hat aber nur bei Porphyrien eine Bedeutung und wird unter physiologischen Bedingungen nicht genutzt.

zu untersuchenden Läsionen befindet, penetrieren. Die intakte Hornschicht der normalen Haut ist hierfür weniger durchlässig [KP92, WLL00]. Durch Zugabe von penetra-tionsfördernden Substanzen wie Dimethylsulphoxid (DMSO) zur Emulsion, kann die Fluoreszenzintensität zusätzlich gesteigert werden [MKR95]. Da aber auch die Fluoreszenz in normaler Haut erhöht wird, scheinen solche Substanzen nicht die Selektivität verbessern zu können [AAB98].

Durch erhöhte Gefäßpermeabilität und insuffizienten Lymphabfluss liegt in Tumoren ein, gegenüber dem normalen Gewebe erhöhter nach außen hin gerichteter Flüssigkeitsdruck und ein größerer Anteil an freiem Wasser vor [Jai87]. Dadurch ist in Tumoren eine bessere und schnellere Diffusion von Farbstoffen als in normalem Gewebe möglich. Sehr wahrscheinlich ist, dass auch bei der Aufnahme und/oder bei der anschließenden Metabolisierung zu PpIX in der Hämbiosynthese eine selektive Anreicherung auftritt [KSG89, AHD94, AAB98].

3.4.4 Fluoreszenzmessplatz und Bildauswertung

Zur Quantifizierung von ALA-induzierten Porphyrinen wurde die unter Anregung emittierte Fluoreszenz mit einem bildgebenden Verfahren detektiert, normiert und gegen Störeinflüsse korrigiert.

Anregung und Detektion der Fluoreszenz

Zur Anregung der Fluoreszenz (λ_{ex}) wurde eine inkohärente Lichtquelle (D-Light, Karl Storz GmbH, Tuttlingen) verwendet, die mittels einer Xenon-Hochdrucklampe und eines Bandpassfilters Licht im UV-/blauen Spektralbereich von 400–430 nm (Breite bei halbem Maximum) erzeugt (Abb. 3.13). Das Licht wurde über einen eingekoppelten Flüssigkeitslichtleiter und ein Linsensystem zur Parallelisierung des Lichtstrahls auf das zu untersuchende Areal gebracht (Abb. 3.14). Die Anregungsintensität am Ort der Läsion betrug dabei etwa 2–3 mW/cm².

Die emittierte Fluoreszenz (λ_{em}) wurde durch einen Kantenfilter ($\lambda_c = 610$ nm) vom Anregungslicht getrennt und von einer 8-Bit-s/w-CCD-Kamera (XC-73CE, Sony) detektiert. Das analoge Videosignal der Kamera wurde dann über eine Framegrabber-Karte (MVC-150/40 mit AM-VS Modul, ITI, Massachusetts) digitalisiert und mit einer Auflösung von 752×582 Pixel in Echtzeit (50 Halbbilder pro Sekunde) auf einem PC dargestellt. Neben dem Fluoreszenzbild kann zur Dokumentation im Hinblick auf spätere Behandlungen mittels einer CCD-Farbkamera (XC-003P, Sony) zusätzlich ein deckungsgleiches Auflichtbild generiert werden.

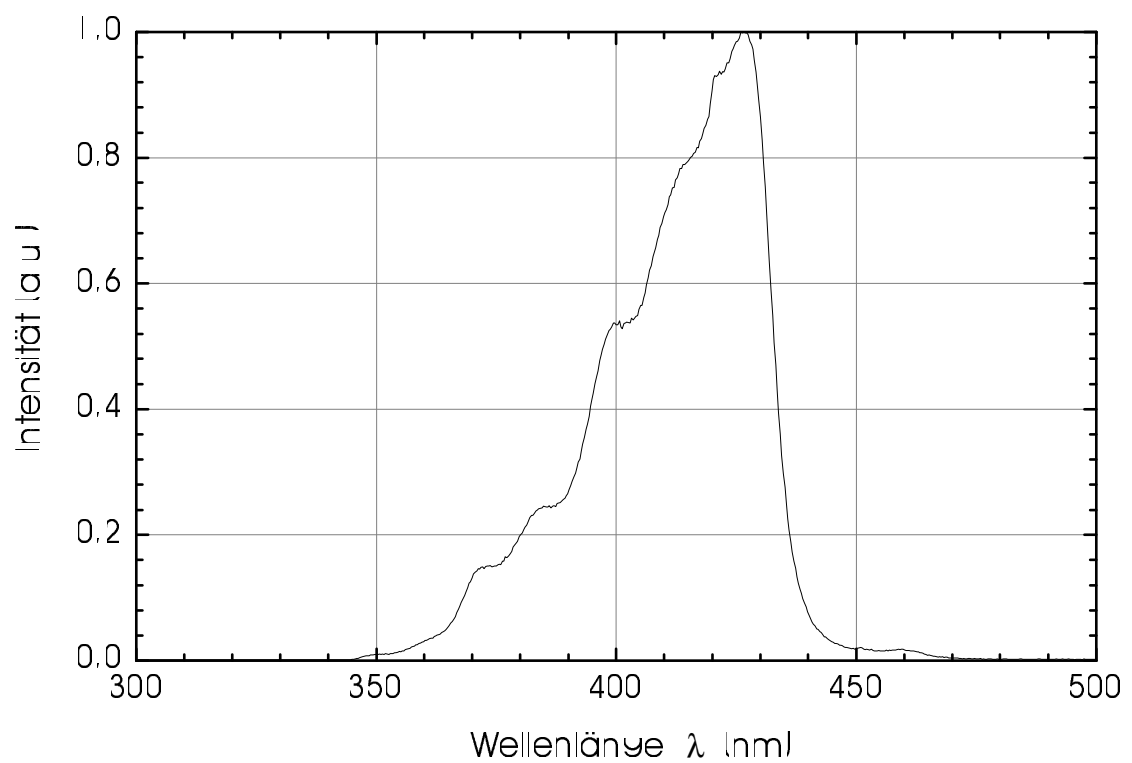


Abbildung 3.13: Spektrum der inkohärenten Lichtquelle (D-Light, Karl Storz GmbH, Tuttlingen) zur Anregung der Fluoreszenz.

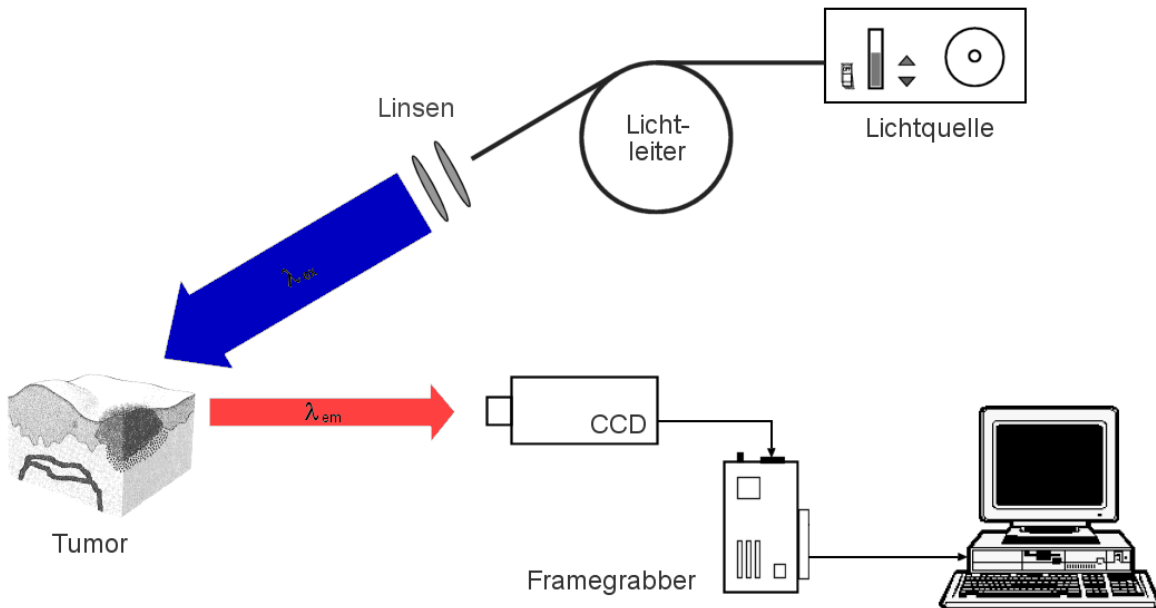


Abbildung 3.14: Schematische Darstellung der Visualisierung von Tumoren der Haut am Patienten.

Referenzierung und Normierung

Die gemessenen Fluoreszenzintensitäten können durch Verwendung eines Referenzsignals quantitativ (absolut) ausgewertet oder durch Verhältnisbildung auf eine Bezugsintensität normiert werden.

Da die Beleuchtungsverhältnisse bei Fluoreszenzmessungen insbesondere an Patienten nur schwer zu standardisieren sind, muss zur quantitativen Auswertung der Messungen ein Referenzsignal mit bekannter Intensität herangezogen werden. Grundsätzlich eignet sich dafür jedes Material, das unter Bestrahlung ein detektierbares Signal liefert. Die abgestrahlte Intensität sollte aber linear mit der Anregungsintensität ansteigen, damit der auf das Referenzsignal bezogene Wert proportional zur Fluoreszenzintensität des Objekts ist. Zudem sollte die Referenzintensität mit der des Objekts vergleichbar sein, um das Fluoreszenzlicht nicht zu überblenden. Bei geeignet gewähltem Referenzsignal kann die Angabe der detektierten Intensitäten auch in Lichtleistung (mW) erfolgen.

In den folgenden Untersuchungen wurde als Referenzsignal das von einer Zahnabdruckmasse (Impregum-F, Espe-Pharma, Seefeld) reflektierte Anregungslicht verwendet (Abb. 3.15). Impregum-F wurde bereits in früheren Untersuchungen als Fluoreszenzstandard eingesetzt [AHD94, LAB97] und reflektiert einfallendes Licht proportional

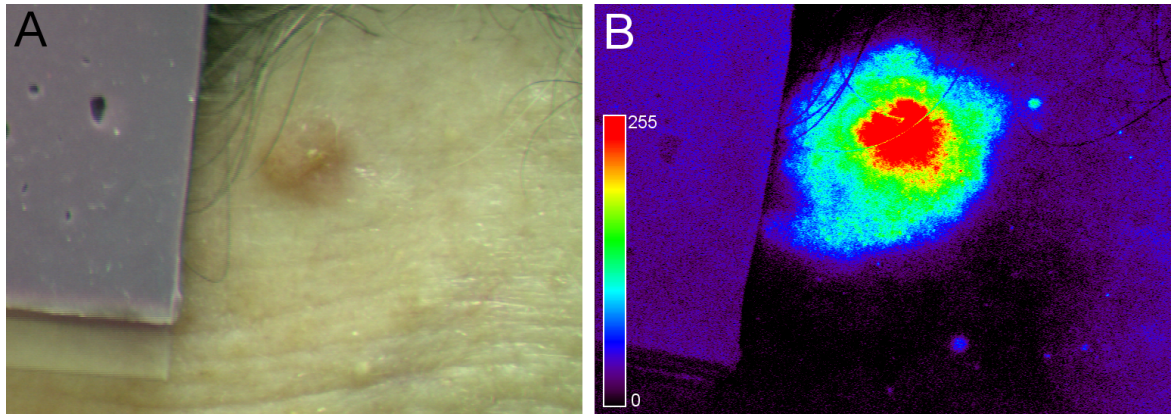


Abbildung 3.15: Referenzierung der Fluoreszenzintensität durch Verwendung eines Referenzsignals. (A) Referenz (auf Objektträger aufgetragene Zahnabdruckmasse; Erklärungen siehe Text) neben einem Basalzellkarzinom an der Stirn eines 50-jährigen Patienten. (B) Bildausschnitt wie in A während der FD (Falschfarbendarstellung). Als Referenzsignal dient der mittlere Grauwert der Referenz (35). Bei Kenntnis der Reflexions-Charakteristik (Abb. 3.16) kann daraus die Anregungsintensität ($3\text{mW}/\text{cm}^2$) ermittelt werden.

zur Intensität (Abb. 3.16). Idealerweise sollte als Referenzsignal nicht Reflexions- sondern Fluoreszenzlicht benutzt werden, da die Reflexion vom Einfallswinkel abhängig ist, während Fluoreszenzlicht isotrop abgestrahlt wird.

Bei der Normierung auf eine Bezugsintensität innerhalb des Fluoreszenzbildes werden die gemessenen Helligkeitswerte als Vielfache dieser Intensität (z. B. die des Normalgewebes) angegeben. Dadurch werden Fluoreszenzunterschiede deutlicher sichtbar und die Festlegung eines Schwellwertes möglich (s. Abschnitt 3.4.6).

Shading-Korrektur

Durch inhomogene Ausleuchtung des Objekts (schräger Lichteinfall, divergente Bestrahlung, Intensitätsprofil der Lichtquelle, Streulicht) und die physiologisch bedingte Krümmung des untersuchten Areals (v. a. Gesicht, Arme, Beine) kommt es bei bildgebenden Verfahren zu einem Helligkeitsgradienten über der Fläche (*Shading*). Das Shading in einem Bild kann durch Generierung eines „Hintergrundbildes“ oder analytische Methoden korrigiert werden.

Als Hintergrundbild wird eine gleichmäßig reflektierende oder fluoreszierende Fläche bezeichnet, die unter identischen Verhältnissen wie das Fluoreszenzbild aufgenommen

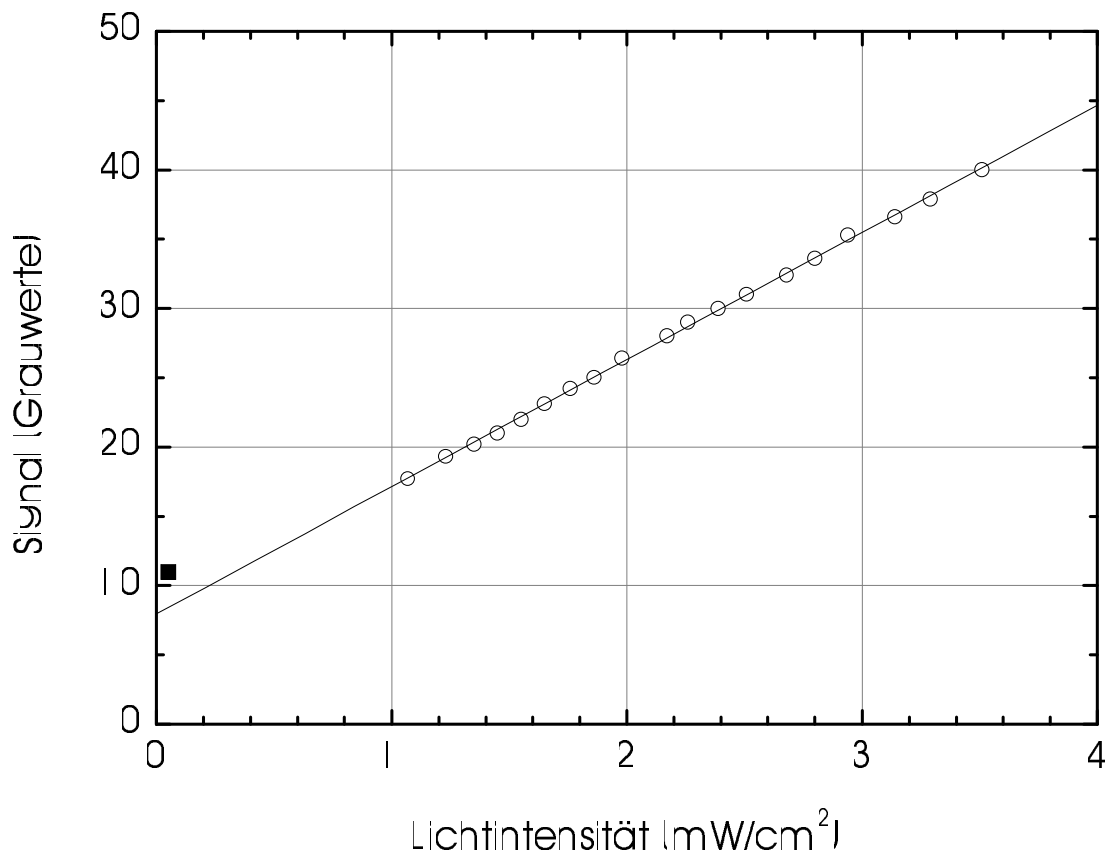


Abbildung 3.16: Reflexions-Charakteristik des Referenzsignals (Impregum-F). Der Wert für Lichtintensität 0 mW/cm^2 (kein Anregungslicht) ergibt sich aus dem Rauschsignal der Kamera.

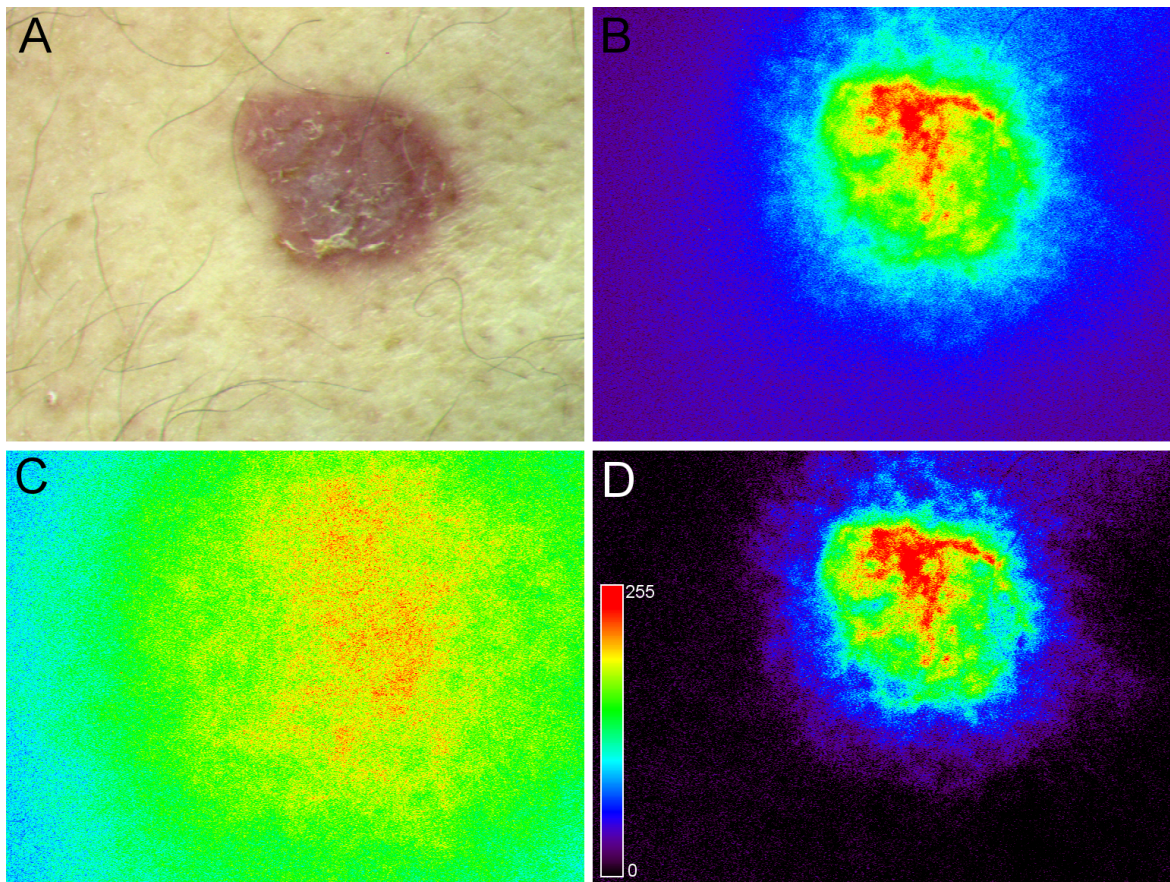


Abbildung 3.17: *Shading-Korrektur bei Fluoreszenzbildern. A Basalzellkarzinom am Oberarm eines 50-jährigen Patienten. B Bildausschnitt wie in A während der FD mit starkem Helligkeitsgradienten (Falschfarbendarstellung). C Hintergrundbild zu B (vom Anregungslicht bestrahltes Blatt Papier). D Korrigiertes Bild.*

wurde. Insbesondere sollten Position und Neigung der Lichtquelle gegenüber dem Objekt und die Krümmung identisch sein. Zur Generierung des Hintergrundbildes eignet sich ein Blatt Papier sehr gut, da dieses leicht der Form des Objekts angepasst werden kann und die enthaltenen Aufhellerstoffe ausreichend hell fluoreszieren.

Das Prinzip der Shading-Korrektur besteht darin, den im Fluoreszenzbild enthaltenen Helligkeitsgradienten mithilfe des Hintergrundbildes, das den selben Gradienten enthält, zu eliminieren. Dazu wird bei Kameras mit linearer (logarithmischer) Charakteristik (d. h. Lichtintensität vs. Signalstärke) das Fluoreszenzbild durch das Hintergrundbild dividiert (das Hintergrundbild vom Fluoreszenzbild subtrahiert). Das Ergebnis entspricht einem, bei ebener Geometrie und homogener Ausleuchtung generierten Bild (Abb. 3.17).

Die Generierung eines Hintergrundbildes kann auch nachträglich erfolgen. Dazu werden Bildpunkte, die gleiche Intensität haben sollten (z. B. symmetrisch um die Läsion liegende Punkte des Normalgewebes) durch ein Least-Squares-Verfahren an eine „Hintergrundfunktion“ angefügt. Wählt man für die Hintergrundfunktion H ein Polynom 2. Ordnung, dann hat die überlagerte Hintergrundhelligkeit die Form

$$H(x, y) = a_0 + a_1x + a_2y + a_3x^2 + a_4y^2 + a_5xy. \quad (3.8)$$

Zur Ermittlung der Koeffizienten a_0, \dots, a_5 würden theoretisch sechs Bildpunkte ausreichen, wobei in praktischen Anwendungen aber wesentlich mehr Punkte notwendig sind, um individuelle Helligkeitsschwankungen der Bildpunkte (besser Bildflächen) auszugleichen [Rus95].

3.4.5 Fluoreszenzintensitäten und -kinetiken von Läsionen der Haut

Die am häufigsten auftretenden Tumoren der Haut sind das *spinozelluläre* und *Basalzellkarzinom*. Beide Tumoren gehen von der Epidermis aus: das spinozelluläre Karzinom (Spi-Ca) von Keratinozyten bzw. hautnahen Schleimhäuten, das Basalzellkarzinom von undefinierten Zellen des Basallagers der Epidermis (siehe dazu auch Abschnitt 3.4.6). In den meisten Fällen geht das Spi-Ca aus typischen Vorgängerläsionen (*Präkanzerosen*) hervor. Hierzu zählen u. a. aktinische Keratosen und Morbus Bowen.

Die häufigste Präkanzerose ist die *aktinische*¹¹ *Keratose*. Sie tritt meist multipel, etwa ab dem 50. Lebensjahr auf chronisch UV-geschädigter Haut auf. Bei progressivem Wachstum kann die aktinische Keratose zum Plattenepithelkarzinom entarten (*de facto*-Häufigkeit ca. 20 % [Fri98]). Klinisch können aktinische Keratosen nur schwer von Plattenepithel- und Basalzellkarzinomen zu unterscheiden sein.

Morbus Bowen ist eine relativ häufige, obligate¹² Präkanzerose vom flächigen Typ. Sie tritt etwa ab dem 60. Lebensjahr meist vereinzelt auf und ist nicht an lichtexponierte Regionen gebunden. Sie wird häufig sowohl vom Patienten als auch vom Arzt als Ekzem interpretiert und jahrelang erfolglos behandelt.

¹¹lichtinduzierte

¹²Man unterscheidet *obligate* und *fakultative* Präkanzerosen (Tab. 18.4 in Ref. [Fri98]): erstere sind präinvasive Plattenepithelkarzinome, d. h. Läsionen, in denen Klone neoplastischer Zellen zur Gänze intraepithelial liegen (Carcinoma *in situ*); letztere sind heterogene, nicht-neoplastische Zustände der Haut, in denen karzinogene Stimuli wirksam sind (seltene Karzinomentstehung).

Die *seborrhoische Keratose* ist ein benignes Papillom der Haut und markantes Merkmal im Alter („Alterswarze“). Sie ist der häufigste Tumor der Haut und vermutlich des menschlichen Organismus überhaupt, hat aber nur kosmetische Bedeutung.

Mittels der FD kann die Früherkennung und Abgrenzung dieser präkanzerösen und kanzerösen Hautveränderungen erleichtert werden. Dabei stellt die FD aber keine eigenständige Diagnostikmethode dar. Sie soll neben der Anamnese und dem Hautbefund des Patienten vielmehr ein zusätzliches Hilfsmittel bei der Entscheidungsfindung des Arztes sein. Eine sichere Diagnose kann letzten Endes nur durch die histologische Untersuchung einer Gewebeprobe gestellt werden.

Um den optimalen Zeitpunkt für die Durchführung der FD und PDT zu finden, muss der zeitliche Verlauf der Fluoreszenz (*Fluoreszenzkinetik*) nach Applikation eines Photosensibilisators in den Läsionen und im umliegenden Normalgewebe untersucht werden. Während für die PDT die Fluoreszenz (und damit die Farbstoffkonzentration) im Gewebe möglichst groß sein soll, ist für die FD ein möglichst großer Kontrast zwischen Tumor und umliegender Haut wünschenswert.

Material und Methoden

Zur Untersuchung der Läsionen wurden zwei unterschiedliche ALA-Grundlagen verwendet: 20 %ige ALA-Creme (Wasser-in-Öl-Emulsion mit Psoralon-Fettcreme; ALA: Medac GmbH, Hamburg) und 20 %iges ALA-Gel, das zusätzlich 40 % DMSO enthielt (alle %-Angaben beziehen sich auf das Volumen). Nach Auftragen der ALA-Grundlage wurden die Läsionen okklusiv verschlossen (Tegaderm, 3M-Health-Care, Borken) und mit Alufolie vor Ausbleichen (*Photobleaching*) geschützt. Nach Ende der Inkubation wurde das übrige ALA entfernt und unverzüglich mit den Messungen begonnen. Die Anregung und Detektion der Fluoreszenz erfolgte mit dem in Abschnitt 3.4.4 beschriebenen Fluoreszenzmessplatz. Alle gemessenen Fluoreszenzintensitäten wurden auf das Referenzsignal (Impregum-F) normiert.

Ergebnisse

Vergleicht man die Fluoreszenz von präkanzerösen und kanzerösen Hautveränderungen für verschiedene Inkubationszeiten, so stellt man fest, dass die emittierte Fluoreszenzintensität mit zunehmender Inkubationsdauer ansteigt (Abb. 3.18). Abgesehen von großen, interindividuellen Abweichungen kann die Fluoreszenzintensität in erster Näherung durch eine lineare Abhängigkeit von der Inkubationszeit beschrieben werden (Tab. 3.1). Nach Inkubation von Basalzellkarzinomen mit ALA-Gel (Steigung B

Läsionen	n	A	B
Basalzellkarzinome (Creme)	85	$1,2 \pm 0,2$	$0,19 \pm 0,08$
Basalzellkarzinome (Gel)	43	$1,0 \pm 0,4$	$0,47 \pm 0,16$
Aktinische Keratosen	49	$1,6 \pm 0,6$	$0,19 \pm 0,12$
Morbus Bowen [†]	11	$0,8 \pm 0,7$	$0,18 \pm 0,16$
Seborrhoische Keratosen ^{†*}	5	$0,6 \pm 0,1$	$0,01 \pm 0,05$

Tabelle 3.1: Abhängigkeit der Fluoreszenzintensität I_F/I_R von der Inkubationszeit t_I für verschiedene präkanzeröse und kanzeröse Hautveränderungen. Die Parameter entsprechen der Beziehung $I_F/I_R = A + B t_I$ (Geraden siehe Abb. 3.18); n ist die Anzahl der Läsionen; [†] durch Biopsie gesichert; * Daten nicht gezeigt.

$\approx 0,5$) stieg die Fluoreszenz deutlich schneller mit der Inkubationszeit an als für Basalzellkarzinome, die mit ALA-Creme inkubiert wurden ($B \approx 0,2$), da das enthaltene DMSO penetrationsfördernd wirkt. Für Aktinische Keratosen und Morbus Bowen (überwiegend mit ALA-Creme inkubiert) beträgt die Steigung ebenfalls etwa 0,2. Der für $t_I = 0$ interpolierte Wert (Achsenabschnitt A) entspricht der mittleren Autofluoreszenz in den untersuchten Hautarealen. Die Autofluoreszenz ist für Aktinische Keratosen ($1,6 I_R$) am höchsten und für Seborrhoische Keratosen ($0,6 I_R$) am niedrigsten. Für Basalzellkarzinome und Morbus Bowen beträgt die mittlere Autofluoreszenz etwa I_R . Der höhere Wert für Aktinische Keratosen könnte auf die Lichtschädigung dieser Hautareale zurückzuführen sein.

Abb. 3.19 zeigt den direkten Vergleich der Fluoreszenzintensitäten in Abhängigkeit von der mittleren Inkubationsdauer und stellt eine starke Zusammenfassung der Werte dar. Die mittlere Fluoreszenzintensität von Basalzellkarzinomen, die mit 20 %igem ALA-Gel inkubiert wurden, war trotz kürzerer Inkubationsdauer rund 20 % höher als nach Inkubation mit 20 %iger ALA-Creme. Auch für Morbus Bowen war die Fluoreszenzintensität trotz doppelt so langer Inkubationsdauer im Mittel niedriger, als für Basalzellkarzinome nach Inkubation mit ALA-Gel. Da sich Seborrhoische Keratosen bei der FD durchgehend als dunkle Gebiete (keine Fluoreszenz) abzeichnen, ist die gemessene Fluoreszenz (rund $0,5 I_R$) deutlich niedriger als für die übrigen Läsionen und weniger stark gestreut. Der Wert liegt sogar noch unter dem für die Autofluoreszenz, was darauf hindeutet, dass die Autofluoreszenz aus diesen Läsionen besonders schwach und/oder die Autofluoreszenz aus tieferen Schichten gelöscht wird.

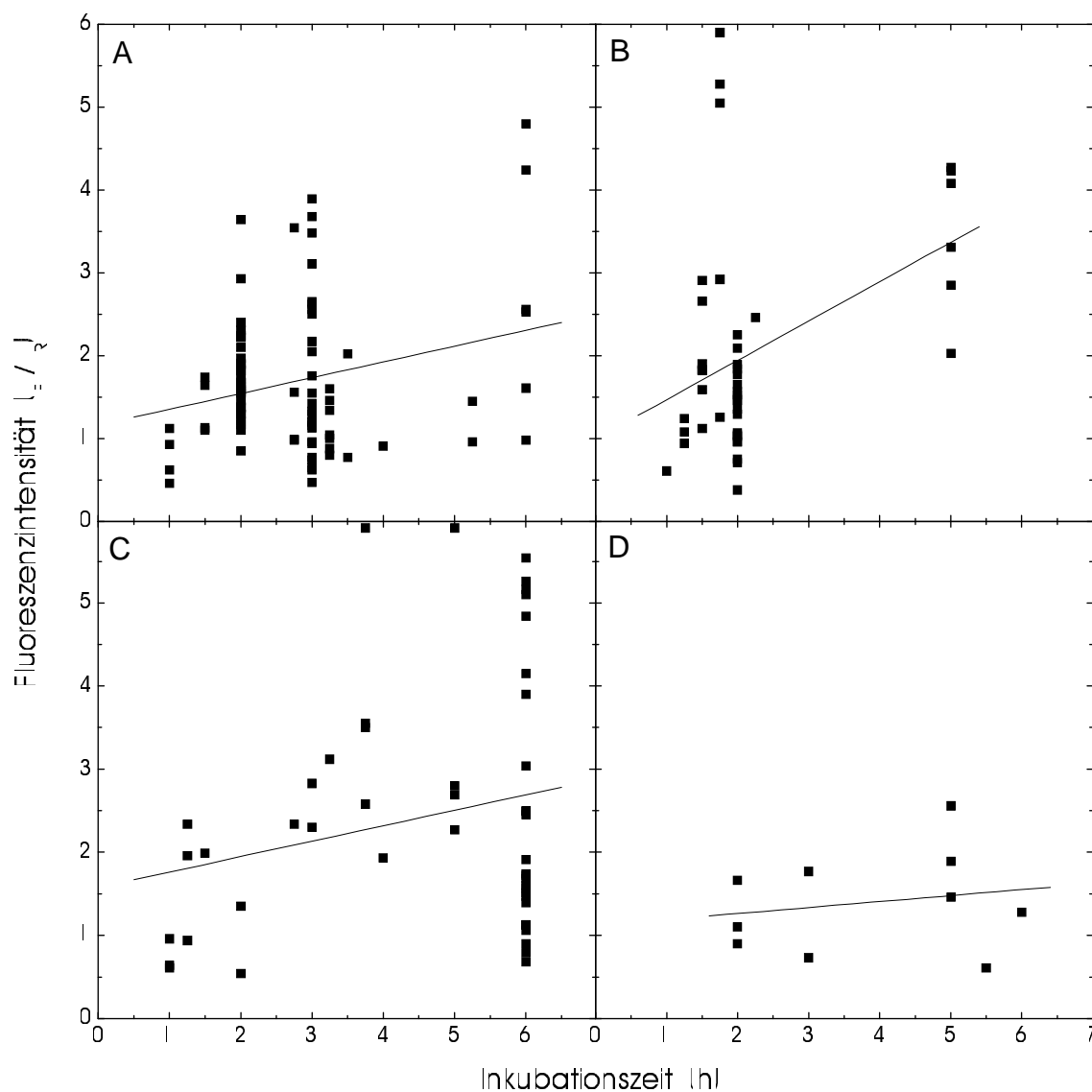


Abbildung 3.18: Fluoreszenzintensität I_F normiert auf das Referenzsignal I_R (Impregum-F) in Abhängigkeit von der Inkubationszeit für verschiedene kanzeröse und präkanzeröse Hautveränderungen. **A** Basalzellkarzinome mit 20 %iger ALA-Creme ($n = 85$); **B** Basalzellkarzinome mit 20 %igem ALA-Gel ($n = 43$); **C** Aktinische Keratosen ($n = 49$); **D** Morbus Bowen[†] ($n = 10$); Ebenfalls eingezeichnet sind die Ausgleichsgeraden (Parameter siehe Tab. 3.1); [†] durch Biopsie gesichert.

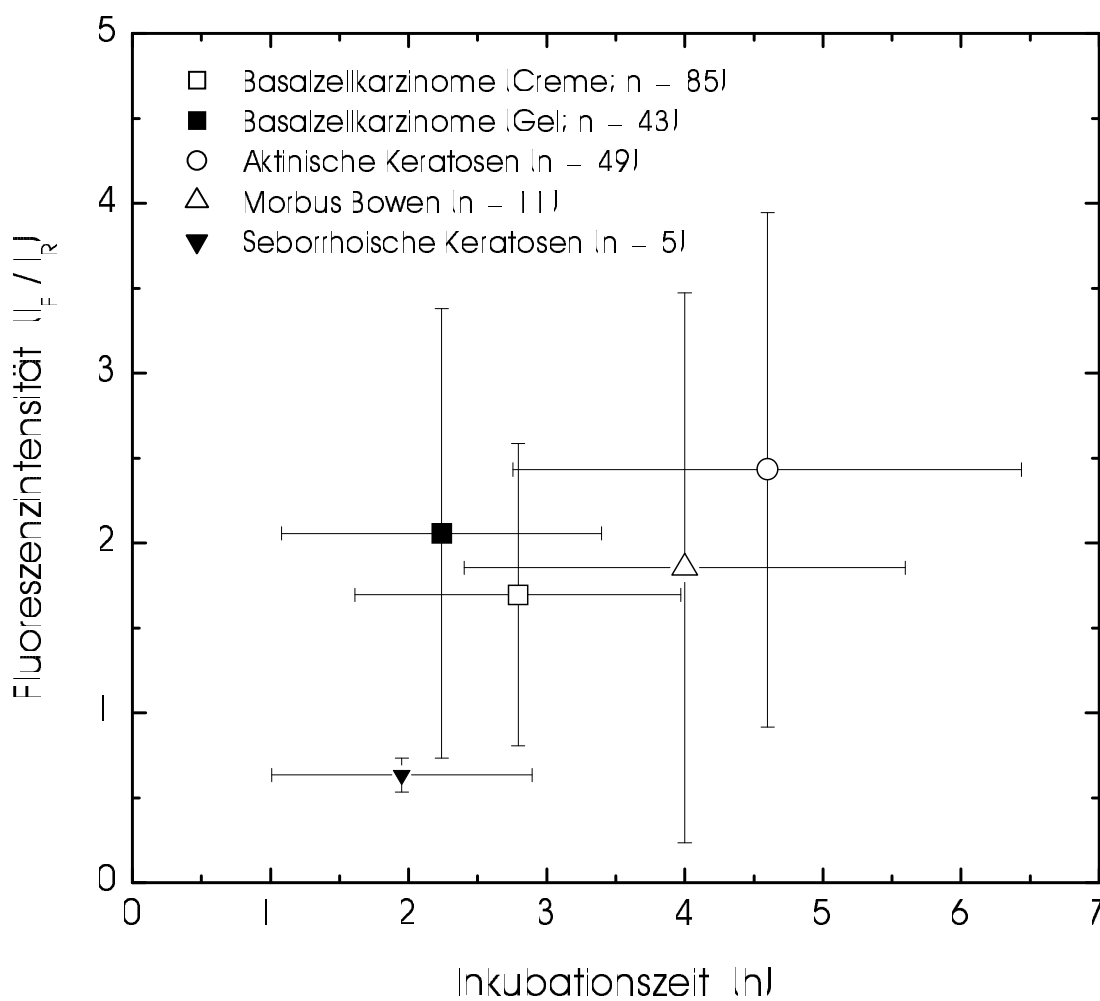


Abbildung 3.19: Fluoreszenzintensität (\pm Standardabweichung) normiert auf das Referenzsignal (Impregum-F) in Abhängigkeit von der mittleren Inkubationszeit (\pm Standardabweichung) für verschiedene präkanzeröse und kanzeröse Hautveränderungen.

Nach Ende der Inkubationszeit (restliches ALA wurde entfernt) stieg die Fluoreszenz z. T. noch erheblich an (Abb. 3.20). Die maximale Fluoreszenzintensität wurde für Basalzellkarzinome ca. 2 h (ALA-Creme) bzw. 3 h (ALA-Gel) und für aktinische Keratosen ca. 3 h nach Inkubationsende erreicht. Für seborrhoische Keratosen ist die Festlegung eines Maximums aufgrund der wenigen Läsionen und des kurzen Beobachtungszeitraumes schwierig; es scheint, als wäre die maximale Fluoreszenzintensität hier erst etwa 4–5 h nach Inkubationsende erreicht worden. Auch im Zeitverlauf der Fluoreszenz zeigte sich, dass die Fluoreszenzintensität in Basalzellkarzinomen, die mit ALA-Gel inkubiert waren (Abb. 3.20 B), zu gleichen Zeitpunkten größer war als in Läsionen, die mit ALA-Creme inkubiert waren (Abb. 3.20 A). Dieselbe Aussage gilt auch für das umliegende Normalgewebe. Am Maximum war die Fluoreszenz nach ALA-Gel im Vergleich zur ALA-Creme in den Läsionen um 26 % ($2,4 I_R$ zu $1,9 I_R$) und im Normalgewebe um 36 % ($1,5 I_R$ zu $1,1 I_R$) erhöht.

Der Kontrast in Fluoreszenzbildern wird durch das Verhältnis der Fluoreszenzintensitäten von Tumor zu umliegendem Normalgewebe (*Fluoreszenzratio*) wiedergegeben. Je größer der Kontrast in den Fluoreszenzbildern ist, umso eher werden initiale Tumoren bei der FD entdeckt. Vernachlässigt man Quenchingeffekte durch hohe Farbstoffkonzentrationen, dann ist die Fluoreszenzratio auch ein direktes Maß für die Selektivität eines Farbstoffes. Für die untersuchten Läsionen betrug die mittlere Fluoreszenzratio $1,74 \pm 0,55$ (Basalzellkarzinome m. ALA-Creme, $n = 65$), $1,62 \pm 0,32$ (Basalzellkarzinome m. ALA-Gel, $n = 70$), $1,34 \pm 0,33$ (aktinische Keratosen, $n = 24$) und $1,14 \pm 0,43$ (seborrhoische Keratosen, $n = 13$). Der zeitliche Verlauf der Fluoreszenzratio (Abb. 3.21) zeigt, dass die maximale Fluoreszenzratio in Basalzellkarzinomen ca. 2 h nach Inkubationsende erreicht wurde, wobei das Fluoreszenzverhältnis für ALA-Creme im Beobachtungszeitraum nahezu konstant blieb.

Fazit

Für die FD von Basalzellkarzinomen am besten geeignet ist die 20 %ige ALA-Creme. Nach 2-stündiger Inkubation wird damit in den Läsionen eine rund 1,7 mal höhere Fluoreszenzintensität erzielt als im umliegenden Normalgewebe. Günstigster Zeitpunkt für die FD ist etwa 2 h nach Inkubationsende.

Geht man davon aus, dass eine höhere Fluoreszenzintensität mit einer höheren Farbstoffkonzentration im Gewebe und damit einem größeren photodynamischen Effekt verbunden ist, muss zur PDT von Basalzellkarzinomen die Verwendung des 20 %ige ALA-Gel empfohlen werden. Günstigster Zeitpunkt nach 2-stündiger Inkubation ist auch hier etwa 2 h nach Inkubationsende.

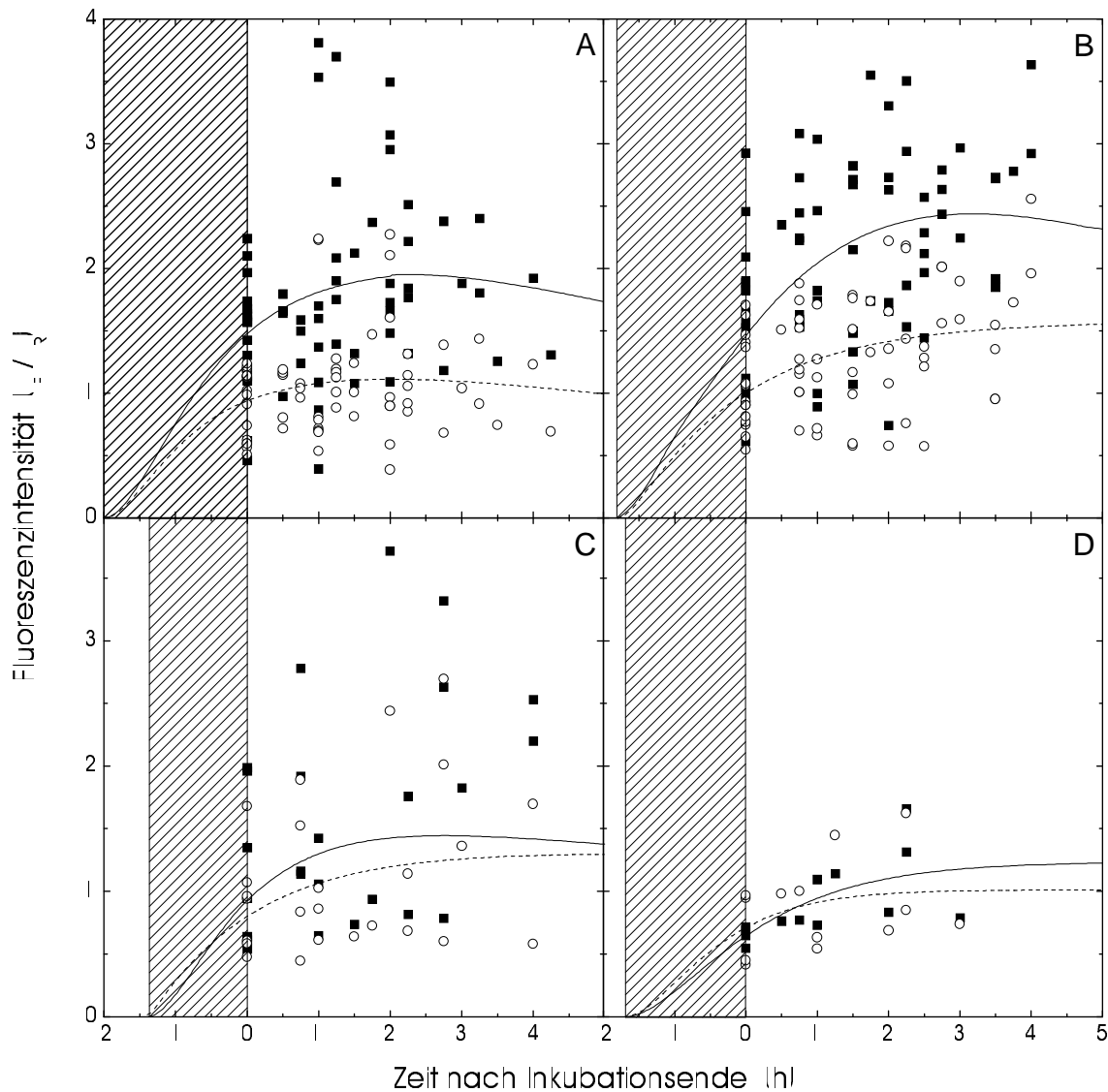


Abbildung 3.20: Zeitlicher Verlauf der Fluoreszenzintensität für verschiedene kanzeröse und präkanzeröse Hautveränderungen (■) und das umliegende Normalgewebe (○). **A** Basalzellkarzinome[†] mit 20 %iger ALA-Creme ($n=18$); **B** Basalzellkarzinome[†] mit 20 %igem ALA-Gel ($n=16$); **C** Aktinische Keratosen[†] ($n=7$); **D** Seborrhoische Keratosen[†] ($n=4$); [†] durch Biopsie gesichert. Die mittleren Inkubationszeiten in Stunden (schraffierte Bereiche) betrugen A: $2,0 \pm 0,5$; B: $1,8 \pm 0,3$; C: $1,4 \pm 0,4$; D: $1,7 \pm 0,8$. Die eingezeichneten Kurven entsprechen der Anpassung an ein 3-Kompartimentmodell [Ack97, AAB98].

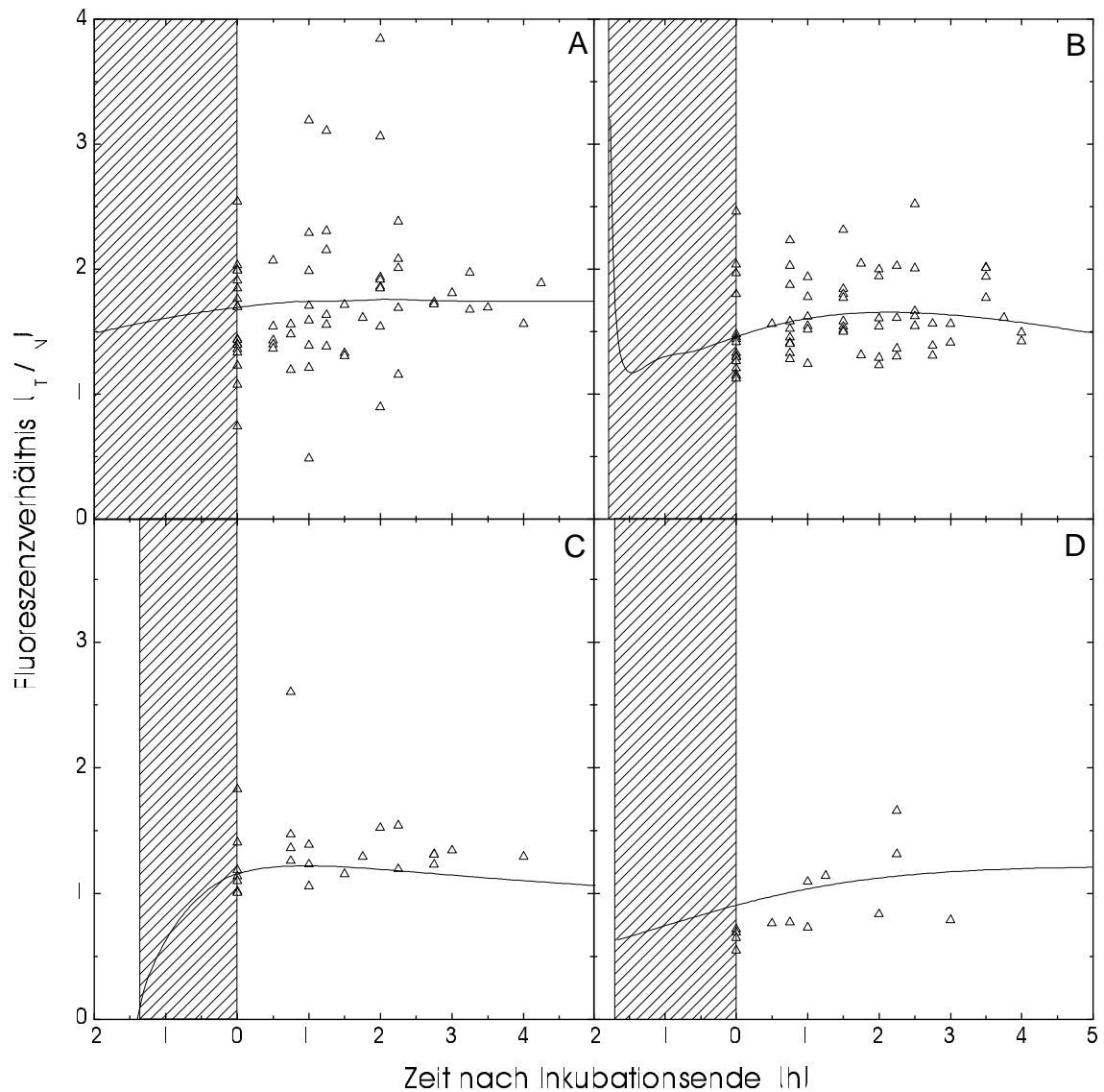


Abbildung 3.21: Zeitlicher Verlauf des Fluoreszenzverhältnisses zwischen Tumor (I_T) und umliegendem Normalgewebe (I_N) für kanzeröse und präkanzeröse Hautveränderungen. **A** Basalzellkarzinome[†] mit 20 %iger ALA-Creme ($n=18$); **B** Basalzellkarzinome[†] mit 20 %igem ALA-Gel ($n=16$); **C** Aktinische Keratosen[†] ($n=7$); **D** Seborrhoische Keratosen[†] ($n=4$); [†] durch Biopsie gesichert. Die mittleren Inkubationszeiten in Stunden (schraffierte Bereiche) betrugen A: $2,0 \pm 0,5$; B: $1,8 \pm 0,3$; C: $1,4 \pm 0,4$; D: $1,7 \pm 0,8$. Die eingezeichneten Kurven ergeben sich aus den Anpassungen der Fluoreszenzintensitäten an ein 3-Kompartimentmodell (siehe Abb. 3.20).

3.4.6 Fluoreszenzgestützte Biopsie von Basalzellkarzinomen

Das Basalzellkarzinom (auch *Basaliom*) ist bei Menschen mit Hauttyp I–III der am häufigsten auftretende nicht-benigne Hauttumor. Die Inzidenz ist steigend (knappe Verdopplung in den letzten 20 Jahren; 3–6 % jährlicher Zuwachs) und beträgt ca. 2/1000 (Frauen) bis 4/1000 (Männer) pro Jahr. Das Basalzellkarzinom tritt vorwiegend mit fortgeschrittenem Alter und zu ca. 90 % im Gesicht auf [Fri98]. Im Gegensatz zu Plattenepithelkarzinomen kommen Basalzellkarzinome auch häufig an kaum UV-belasteten Körperstellen sowie an Körperstellen ohne aktinische Vorschäden und am Rumpf vor. Entstehungsort ist das Stratum basale der Epidermis.¹³

Trotz der geringen Metastasierungswahrscheinlichkeit ($< 0,1\%$) müssen Basalzellkarzinome frühzeitig entfernt werden, da sie eine ausgeprägte Fähigkeit zur lokalen Invasion und Destruktion besitzen. Konventionelle Behandlungsmethoden sind Exzision, Kürettage sowie Kryo- und Radiotherapie. Die Rezidivrate bei Primärtumoren für diese Behandlungen innerhalb von 5 Jahren liegt bei 5–10 % [RCD89]. Immer häufiger wird zur Behandlung von oberflächlichen Basalzellkarzinomen auch die PDT angewendet, da diese sehr gute kosmetische Ergebnisse erzielt.

In vorbehandelten oder vernarbten Arealen kann die Diagnose von Basalzellkarzinomen oft sehr schwierig sein. Insbesondere hängt die richtige Wahl der Entnahmestelle von Gewebeproben von der Erfahrung des behandelnden Arztes ab. In diesem Abschnitt wird anhand eines Fallberichts demonstriert, wie bei der Untersuchung von Risikopatienten unter Verwendung der FD nach topischer Gabe von ALA eine gezieltere Gewebeentnahme ermöglicht werden kann und so bereits zu einem sehr frühen Zeitpunkt Basalzellkarzinome entdeckt und behandelt werden können.

Fallbericht

Anamnese: Bei dem jetzt 75-jährigen Patienten traten schon im 4. Lebensjahrzehnt oberflächliche, multizentrische Basalzellkarzinome segmentartig am rechten Oberschenkel auf. Anamnestisch fanden sich keine Hinweise auf eine vermehrte Sonnenexposition, Arsenintoxikation oder das Vorliegen eines Gorlin-Goltz-Syndroms. Neben Kryochirurgie wurde zweimal eine großflächige CO₂-Lasertherapie durchgeführt. Nach erneutem Auftreten von Rezidiven wurde eine PDT mit 5-ALA durchgeführt. Anlässlich einer Kontrolluntersuchung nach 6 Monaten stellte sich der Patient erneut vor.

¹³Aufgrund der histologischen Ähnlichkeit glaubte man früher, dass Basalzellkarzinome Tumoren der Basalschicht der Epidermis seien; heute ist man der Meinung, dass sie sich von einer undefinierten Zelle des Basallagers ableiten, die die Fähigkeit zur Bildung von Adnexstrukturen erhalten hat [Fri98].

Hautbefund: Im Bereich ventral und lateral des rechten Oberschenkels zeigte sich ein ca. 15×15 cm großes Areal mit zahlreichen disseminierten, z. T. konfluierenden Rötungen, sowie unscharf begrenzte, infiltrierte Plaques in vernarbtem Gewebe mit Hyper- und Hypopigmentierung (Abb. 3.22 A). Klinisch waren keine Anzeichen für ein Rezidiv zu erkennen, da der o. g. Hautbefund eine Diagnose erschwerte. Um aufgrund der Anamnese eine erneute Rezidivbildung frühzeitig ausschließen zu können, wurde eine FD nach topisch applizierter 5-ALA durchgeführt.

Material und Methoden

Das zu untersuchende Areal wurde ca. 4 h mit 20%iger ALA-Creme (Wasser-in-Öl-Emulsion mit Psoralon-Fettcreme, ALA: Medac GmbH, Hamburg) unter Okklusion inkubiert. Zusätzlich wurde durch Abdeckung mit Alufolie ein Ausbleichen von bereits gebildeten Porphyrinmolekülen (*Photobleaching*) verhindert.

Die Anregung und Detektion der Fluoreszenz erfolgte mit dem in Abschnitt 3.4.4 beschriebenen Fluoreszenzmessplatz.

Ergebnisse

Unter Anregung mit blauem Licht hoben sich mehrere, auch mit bloßem Auge sichtbare, scharf begrenzte, tiefrot-fluoreszierende Gebiete von dem sonst schwach fluoreszierenden Hintergrund ab. Auf dem von der CCD-Kamera generierten Fluoreszenzbild erschienen Gebiete mit hoher Fluoreszenzintensität als helle Leuchtinseln (Abb. 3.22 B). Einige stärker fluoreszierende Gebiete lagen unterhalb eines vernarbten Areals, das sich im Fluoreszenzbild dunkel darstellte. Insgesamt zeigten die Rohdaten aber wenig Kontrast, was für die Beurteilung des untersuchten Areals keine entscheidenden Vorteile brachte.

Abb. 3.22 C zeigt die durch digitale Bildverarbeitung aufbereitete Darstellung des Fluoreszenzbildes. Zur objektiven Beurteilung der gemessenen Fluoreszenzintensitäten wurden die Werte auf die Intensität des Normalgewebes (Kästchen) normiert, sodass die in der Skala angegebenen Intensitätsverhältnisse entstehen. Zu erkennen ist jetzt eine Stelle (Pfeil) mit einer wesentlich höheren Fluoreszenzintensität (gelb-rot) im Vergleich zu allen übrigen Stellen (blau-grün); nicht-fluoreszierende Areale erscheinen violett. Die auffällige Stelle wurde während der FD markiert und anschließend mittels Stanzbiopsie entnommen. Die histologische Untersuchung ergab ein ca. 600×400 µm großes, oberflächliches Basalzellkarzinom (Abb. 3.22 D), das durch die Stanzbiopsie *in toto* exzidiert wurde.

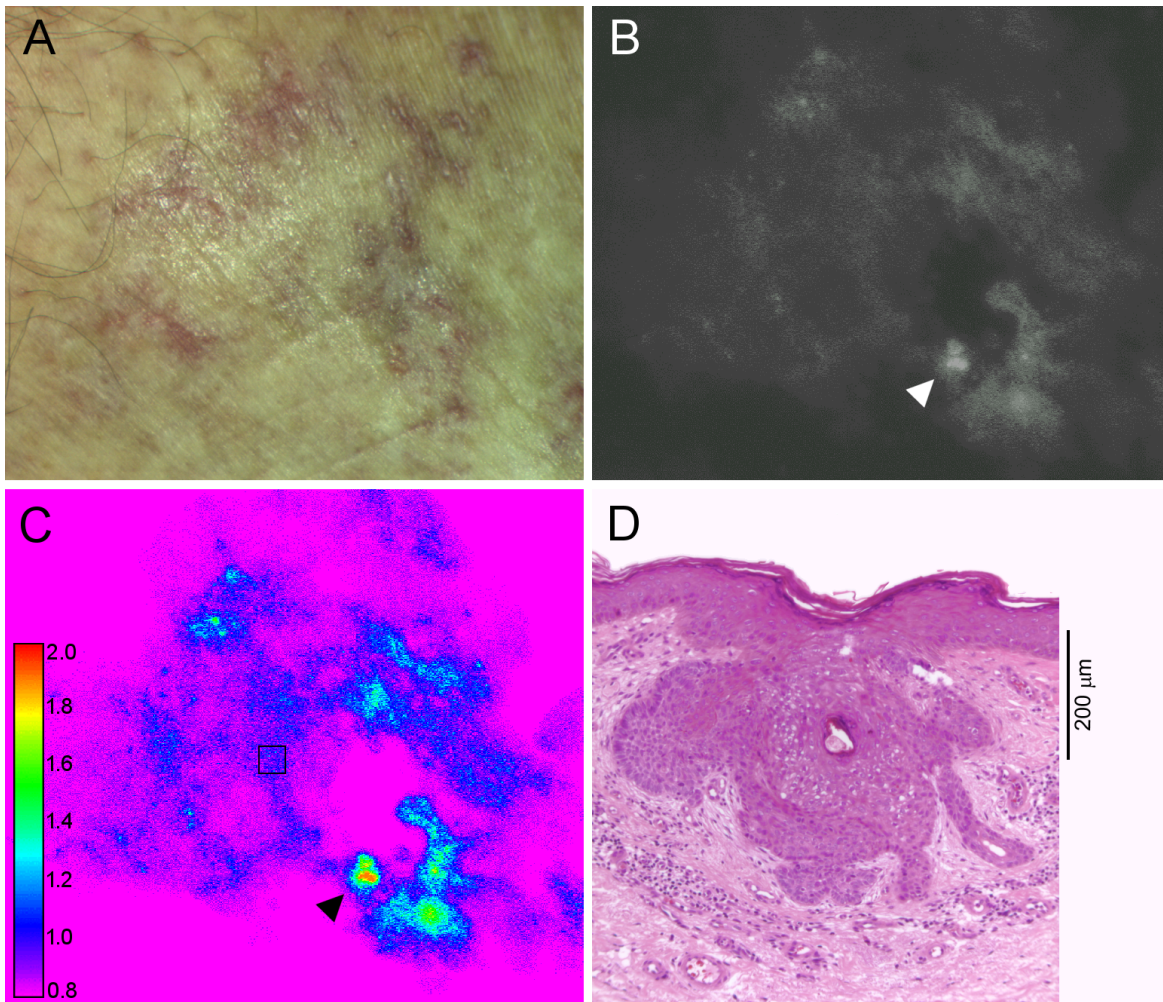


Abbildung 3.22: Fluoreszenzgestützte Biopsie von Basalzellkarzinomen. **A** Verdächtiges Areal am rechten Oberschenkel; zahlreiche Hautveränderungen verhindern eine zuverlässige Diagnose. **B** Bildausschnitt wie in **A** während der FD nach topischer Applikation von ALA für 4 h. Es zeigt sich deutlich eine auffällige Stelle (Pfeil) am Rand einer zuvor behandelten Läsion (dunkler Bereich). **C** Bildausschnitt wie in **B** nach digitaler Bildverarbeitung und in Falschfarbendarstellung. **D** HE-gefärbter Schnitt der entnommenen Biopsie belegt erneutes Basalzellkarzinom, das in toto exzidiert wurde.

Fazit

Besonders bei klinisch schwer zu diagnostizierenden Befunden stellt die FD ein nützliches Hilfsmittel bei der Entnahme von Hautproben dar. Durch Anwenden von digitaler Bildbearbeitung ist eine quantitative und benutzerunabhängige Auswertung der detektierten Fluoreszenzintensitäten möglich und der Kontrast zwischen Tumor- und Normalgewebe kann so herausgearbeitet werden, dass die Detektion von kleinsten Fluoreszenzherden möglich wird. Das weitgehend intakte Stratum corneum und die Epidermis (Abb. 3.22 **D**) belegen, dass die gezeigte Methode auch in der Lage ist, in der Tiefe versteckte Zellverbände aufzuspüren.

Zusätzliche Informationen über die Malignität von Läsionen könnten auch durch die Analyse von grundlegenden Strukturen in den Fluoreszenz- und RGB-Bildern gewonnen werden [MBA01].

Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss von photophysikalischen Faktoren auf die Fluoreszenzdiagnostik (FD) von Tumoren der Haut *in vitro* und *in vivo* untersucht. Dazu wurden die optischen Eigenschaften der Haut ermittelt und das Verhalten der Farbstoffe Indocyaningrün (ICG) und Protoporphyrin IX (PpIX) in verschiedenen Lösungsmitteln sowie im Tiermodell und in humanen Tumoren der Haut bestimmt.

Die optischen Eigenschaften der Haut beeinflussen sowohl die Ausbreitung des Anregungslichts wie auch die Emission des Fluoreszenzlichts bei der FD. Aufgrund des Brechungsindexunterschieds zwischen Luft ($n = 1$) und Haut ($n \approx 1,5$) werden mindestens 4 % des Anregungslichts an der Hautoberfläche reflektiert. Ein anfangs kollimierter Strahl wird beim Eintritt in die Haut aufgeweitet, da wegen der Rauheit der Oberfläche diffuse Brechung auftritt. Bei schrägem Lichteinfall wird zudem der Querschnitt des Strahls vergrößert.

Im Gewebe kann das Licht durch endogene Chromophore absorbiert und gestreut werden. Dabei nehmen sowohl die Absorption wie auch die Streuung mit zunehmender Wellenlänge ab, sodass im roten und nahen IR die größte Eindringtiefe von Licht erreicht wird. Im sichtbaren Spektralbereich werden die optischen Eigenschaften der Haut im Wesentlichen durch die starke Streuung von Kollagenfasern in der Dermis bestimmt. Die Epidermis ist zwar ebenfalls stark streuend, jedoch zu dünn, um großen Einfluss auszuüben. Die Intensität und Richtungsabhängigkeit der Streuung hängen von der Dichte, Größe und Gestalt sowie dem Brechungsindex der Streuzentren ab. Zur Hautoberfläche zurückgestreute und totalreflektierte Photonen erhöhen die Lichtintensität in den ersten 100stel Millimetern des Gewebes auf fast das Doppelte. Die Absorption wird im sichtbaren Spektralbereich durch Melanin und Chromophore im Blut (Hämoglobin, Bilirubin, Karotene) hervorgerufen. Im UV ist die Absorption sehr stark und wird durch Aminosäuren, DNA und kleine aromatische Moleküle verursacht.

Wurde ein im Gewebe angereicherter Farbstoff vom Anregungslicht erreicht, strahlt er Fluoreszenzlicht isotrop in das Gewebe ab. Dabei kann die Emission der Farbstoffmoleküle durch fluoreszenzlöschende Prozesse und die Reabsorption von Fluoreszenzlicht

vermindert werden. Die Reemission von Fluoreszenzlicht ist etwa um den Faktor 10 kleiner als die Reabsorption. Geht man deshalb bei der Interpretation der gemessenen Fluoreszenzintensitäten von einem linearen Zusammenhang zwischen Farbstoffkonzentration und Fluoreszenzintensität aus, führt dies zu einer Unterschätzung der Farbstoffkonzentration.

Die beiden untersuchten Farbstoffe, ICG und PpIX, unterscheiden sich in ihren physikalischen und physiologischen Eigenschaften. ICG bindet nach intravenöser Gabe sehr schnell an Proteine im Blut und bleibt deshalb in den Gefäßen. Mithilfe der intravitalen Fluoreszenzmikroskopie konnte im Tiermodell das Abklingverhalten von ICG nach intravenöser Gabe visualisiert werden. Da die Gefäße in Tumoren sehr viel durchlässiger sind als im normalen Gewebe, kann der Farbstoff in Tumoren extravasieren und den Tumor damit markieren. Bei der Ermittlung der Abklingzeit von ICG aus fluorimetrischen Messungen und durch spektroskopische Bestimmung aus der ICG-Konzentration in Blutplasma ergab sich ein deutlicher Unterschied, der auf die Bindung von ICG an die Endothelzellen der Gefäße und/oder eine Extravasation von ICG in das Gewebe hinweist. Im Fluoreszenzspektrum konnte *in vivo* eine erhebliche Verschiebung des Emissionsmaximums mit abnehmender Konzentration nachgewiesen werden, die annähernd mit den *in vitro* gemessenen Werten übereinstimmte. Dennoch erscheint die Bestimmung der ICG-Konzentration aus der Lage des Emissionsmaximums problematisch zu sein.

Die Absorptions- und Emissionsbanden von ICG liegen im nahen IR, wo Licht sehr gut das Gewebe durchdringen kann. In Wasser setzt schon bei geringen Konzentrationen Dimerisierung ein und die Fluoreszenzquantenausbeute, die für die FD möglichst groß sein sollte, wird aufgrund von interner Konversion und Triplettübergängen herabgesetzt. In Ethanol dimerisiert ICG nur wenig und die spektralen Eigenschaften werden bei großen Konzentrationen durch die Wechselwirkungen von eng benachbarten Molekülpaaren dominiert. Durch die hohe Affinität gegenüber Plasmaproteinen setzt die Dimerisierung von ICG in Blutplasma erst bei höheren Konzentrationen ein und die Fluoreszenzquantenausbeute bleibt stabil. Die Abweichung vom linearen Zusammenhang zwischen Fluoreszenzintensität und Farbstoffkonzentration ist für ICG gut abzuschätzen und beträgt bis zu 10 %. Durch die starke Überlappung von Absorptions- und Emissionsspektrum werden je nach Wellenlänge bis zu 6 % des emittierten Fluoreszenzlichts wieder reabsorbiert.

Durch die hohe Eindringtiefe von Licht in das Gewebe an den Absorptions- und Emissionsmaxima von ICG und die Fluoreszenzquantenausbeute von nahezu 10 % in Blutplasma ist ICG gut zur FD von Tumoren der Haut geeignet. Die eng beieinanderliegenden Absorptions- und Emissionsbanden und die mangelnde Leistung der Anre-

gungslichtquellen im nahen IR führen jedoch dazu, dass die Detektion des Farbstoffes *in vivo* noch mit technischen Schwierigkeiten verbunden ist.

Im Gegensatz zu ICG entsteht PpIX erst im Gewebe aus der 5-Aminolävulinsäure (ALA); durch die exogene Gabe von ALA werden die Regulationsmechanismen der Hämbiosynthese umgangen und es kommt zur selektiven Anreicherung von Porphyrinen, insbesondere PpIX, in Tumoren. Da ALA ein kleines, wasserlösliches Molekül ist, kann es topisch appliziert werden, wodurch eine generalisierte Sensibilisierung der Patienten vermieden wird.

Da die maximale Absorption von PpIX im blauen Spektralbereich liegt, die Fluoreszenz-emission aber im roten, spielt die Reabsorption von Fluoreszenzlicht bei PpIX keine Rolle. Die Fluoreszenzquantenausbeute nimmt in Dimethylsulfoxid (DMSO) mit steigender Konzentration nur wenig ab, da erst bei hohen Konzentrationen Energietransfer stattfindet. Die Abweichung vom linearen Zusammenhang zwischen Fluoreszenzintensität und Farbstoffkonzentration kann je nach Verteilung des Farbstoffes weit mehr als 10 % betragen, wodurch die Farbstoffkonzentration bei der Interpretation der gemessenen Fluoreszenzintensitäten stark unterschätzt werden kann. Durch die geringe Eindringtiefe von Licht im blauen Spektralbereich, ist die FD mit ALA-induziertem PpIX auf oberflächliche Läsionen beschränkt.

Nach topischer Applikation von ALA stieg die Fluoreszenzintensität in Tumoren der Haut linear mit der Inkubationszeit an. Dabei bewirkte die Zugabe von 40 % DMSO zu einer 20 %igen ALA-Grundlage in Basalzellkarzinomen einen 2,5-fach höheren Anstieg der Fluoreszenz. Nach Entfernen der ALA-Grundlage stieg die Fluoreszenzintensität in den Läsionen noch um bis zu 70 % des Wertes, der unmittelbar nach Inkubationsende erreicht wurde, an. Da nach Zugabe von DMSO zur ALA-Grundlage auch die Fluoreszenz im umliegenden Normalgewebe gesteigert wurde, konnte die Selektivität des Farbstoffes nicht verbessert werden. Die beste Fluoreszenzratio (Verhältnis aus Fluoreszenzintensität im Tumor zum umliegenden Normalgewebe) konnte bei 2-stündiger Inkubation etwa 2 h nach Inkubationsende erzielt werden und betrug im Mittel 1,7. Die Autofluoreszenz in den Läsionen schien in lichtgeschädigten Arealen größer zu sein als in nicht-lichtgeschädigten.

In einem Fallbericht konnte der Nutzen der fluoreszenzgestützten Biopsie von oberflächlichen Basalzellkarzinomen nach topischer Gabe von ALA mit Hilfe eines bildgebenden Verfahrens demonstriert werden. Besonders bei klinisch schwer zu diagnostizierenden Befunden stellt die gezeigte Methode ein nützliches Hilfsmittel bei der Gewebeentnahme dar. Mithilfe von digitaler Bildbearbeitung ist eine quantitative und benutzerunabhängige Auswertung der detektierten Fluoreszenzintensitäten möglich.

Der Kontrast zwischen Normal- und Tumorgewebe läßt sich dabei so verbessern, dass initiale, z. T. subepidermale¹⁴ Tumoren entdeckt werden. Durch größer angelegte Untersuchungen könnte so ein Schwellwert für die Fluoreszenzratio ermittelt werden, der eine objektive Unterscheidung in verdächtiges/nicht-verdächtiges Gewebe erlaubt. Das vorgestellte System könnte dann auch als Resektionshilfe bei Läsionen mit unklarer Tumorausdehnung eingesetzt werden.

¹⁴unter der obersten Hautschicht (Epidermis) wachsend

Anhang A

Photobiologische Hauttypen des Menschen

Entsprechend der individuell sehr unterschiedlichen Hautreaktion auf Exposition mit Sonnenlicht (30 min.) wird der Hauttyp des Menschen eingeteilt [CKS92]:

Typ	Phänotyp	Reaktion auf Sonnenbestrahlung	
		Sonnenbrand	Bräunung
I	sehr helle Haut; Augen: blau, grün rötliche bis rotblonde Haare	immer	nie
II	helle Haut; Augen: blau, grau, braun blonde bis hellbraune Haare	immer	wenig
III	hellbraune Haut; Augen: braun dunkelblonde bis braune Haare	selten	gut
IV	hell- bis mittelbraune Haut; Augen: braun dunkelbraune Haare	nie	immer
V	dunkelhäutige Menschen	nie	immer
VI	Schwarze	nie	immer

Anhang B

Korrekturen zur Messung der Transmission

Kommt es auf dem Weg des Lichts zu Unstetigkeiten im Brechungsindex, tritt Reflexion auf. Dies trifft insbesondere an der Grenzfläche zweier Medien zu. Bei senkrechtem Lichteinfall gilt für die Reflexion $R = (n_2 - n_1)^2 / (n_2 + n_1)^2$, wenn die beiden Medien die Brechungsindizes n_1 und n_2 besitzen. Der Brechungsindex von Gewebe liegt je nach Wassergehalt von 100 % bis 0 % zwischen 1,33 und 1,5 [BL].

Für trockenes Stratum corneum an der Hautoberfläche beträgt n etwa 1,45 [SL77], entsprechend einem Wassergehalt von 30 %. Deshalb wird für die Reflexion an der Grenzfläche Luft | Epidermis, R_1 , ein Wert von 3,4 % angenommen, wobei Effekte, die aufgrund der rauen Oberfläche entstehen, vernachlässigt werden. An der Rückseite der Hautprobe trifft das Licht auf eine nasse Dermis | Glas | Luft-Grenzfläche. Die Brechungsindizes für Dermis (mit etwa 70 % Wassergehalt), die Quarzglasplatte und Luft betragen 1,38, 1,46 und 1. Da zwischen Gewebe | Glas und Glas | Luft Mehrfachreflexion auftritt, beträgt die Netto-Reflexion R_2 an dieser Grenzschicht

$$R_2 = 1 - (1 - R_{2a})(1 - R_{2b})[1 + \sum_i R_{2a}^i R_{2b}^i] , \quad (\text{B.1})$$

wenn R_{2a} die Reflexion an Dermis | Glas (0,1 %) und R_{2b} die Reflexion an Glas | Luft (3,5 %) ist. Die Netto-Reflexion R_2 beträgt demnach 3,6 %.

Um jetzt das tatsächliche Spektrum der Probe, $P_r(\lambda)$, zu erhalten, wird das gemessene Spektrum, $P_m(\lambda)$, gegen die auftretende Reflexion korrigiert gemäß

$$P_r(\lambda) = P_m(\lambda) / (1 - R_1)(1 - R_2) . \quad (\text{B.2})$$

Ebenso wird das Spektrum der Lichtquelle (ohne Probe im Strahlengang) gemessen und gegen die Reflexion korrigiert. Hierbei muss die Grenzfläche Luft | Glas | Luft betrachtet werden. Da es zwischen Luft | Glas und Glas | Luft erneut zu Mehrfachreflexion kommt, beträgt die Netto-Reflexion R_3 hier

$$R_3 = 1 - (1 - R_{2b})^2 [1 + \sum_i R_{2b}^{2i}] . \quad (\text{B.3})$$

Für R_3 ergibt sich ein Wert von 6,9 %.

Analog zu Gl. (B.2) wird das gemessene Spektrum der Lichtquelle $H_m(\lambda)$ korrigiert zu

$$H_r(\lambda) = H_m(\lambda)/(1 - R_3) . \quad (\text{B.4})$$

Um schließlich die tatsächliche Transmission T_r durch die Probe zu erhalten, wird das korrigierte Spektrum der Probe $P_r(\lambda)$ durch das korrigierte Spektrum der Lichtquelle $H_r(\lambda)$ dividiert:

$$T_r(\lambda) = \frac{P_r(\lambda)}{H_r(\lambda)} = \frac{P_m(\lambda)}{H_m(\lambda)} \cdot \frac{1 - R_3}{(1 - R_1)(1 - R_2)} \quad (\text{B.5})$$

Der Netto-Korrekturfaktor $C = (1 - R_3)/(1 - R_1)(1 - R_2)$, der die gemessene Transmission $T_m(\lambda) = P_m(\lambda)/H_m(\lambda)$ auf die tatsächliche Transmission $T_r(\lambda) = C \cdot T_m(\lambda)$ korrigiert, beträgt 0,9998, sodass $T_r(\lambda) \approx T_m(\lambda)$ gilt.

Anhang C

Berechnung der Fluoreszenzverteilung

Die Fluoreszenzquantenverteilung $E(\lambda)$ ist definiert durch

$$E(\lambda) = S_i(\lambda)/P_a \quad (\text{C.1})$$

und die Fluoreszenzquantenausbeute ϕ_F durch

$$\phi_F = \int_{\text{em}} E(\lambda) d\lambda . \quad (\text{C.2})$$

$S_i(\lambda)$ ist die intrinsische Emission der Probe pro Wellenlängenintervall (counts/nm, proportional zu Photonen/nm) und P_a die Zahl der absorbierten Photonen des Anregungslichts. P_a ist gegeben durch

$$P_a = \frac{P_0 (1 - R_L)(1 - T_L)}{1 - R_L(1 - T_L)} . \quad (\text{C.3})$$

P_0 ist die Zahl der Anregungsphotonen, die auf die Probe treffen. Der Index L steht für das Anregungslicht. $R_L = (n_L - 1)^2/(n_L + 1)^2$ ist die Reflexion des Anregungslichts beim Eintritt in die Probe, n_L der Brechungsindex bei der Anregungsfrequenz ν_L . $T_L = \exp(-\sigma_L N l)$ ist die Transmission des Anregungslichts durch die Probe. σ_L ist der Absorptionsquerschnitt bei der Anregungsfrequenz ν_L , $N = c \cdot N_A$ die Teilchendichte der Farbstoffmoleküle in der Probe (c ist die Konzentration in mol/Liter, $N_A = 6,022 \times 10^{23} \text{ mol}^{-1}$ die Avogadro-Konstante), l die Dicke der Probe. Der Term $R_L(1 - T_L)$ im Nenner berücksichtigt das rück-reflektierte Anregungslicht (geometrische Reihe).

Im Experiment wird die Fluoreszenzquantenverteilung relativ zu einem Referenzfarbstoff (Index R) mit bekannter Quantenausbeute ϕ_R gemessen. Es gilt dann

$$E(\lambda) = \frac{S_i(\lambda)}{\int_{\text{em}} S_{i,R}(\lambda) d\lambda} \frac{P_{a,R}}{P_a} = \frac{S_i(\lambda)}{\int_{\text{em}} S_{i,R}(\lambda) d\lambda} \frac{(1 - R_{L,R})(1 - T_{L,R})[1 - R_L(1 - T_L)]}{(1 - R_L)(1 - T_L)[1 - R_{L,R}(1 - T_{L,R})]} \phi_R, \quad (\text{C.4})$$

wenn die Zahl der eintreffenden Anregungsphotonen P_0 konstant ist.

Will man $S_i(\lambda)$ in Beziehung zum spektralen Fluoreszenzsignal außerhalb der Probe $S_e(\lambda)$ im detektierten Raumwinkel $\Delta\Omega$ bringen, muss die Reabsorption und Reemission innerhalb der Probe beachtet werden. Es gilt dann

$$S_e(\lambda) = S_i(\lambda)(1 - R_F)(\Delta\Omega/4\pi n_F^2) f_{AE}(\lambda). \quad (\text{C.5})$$

$\Delta\Omega/n_F^2$ ist der detektierte Raumwinkel innerhalb der Küvette, n_F der mittlere Brechungsindex des Farbstoffes im Fluoreszenzbereich. $R_F = (n_F - 1)^2/(n_F + 1)^2$ ist die Reflexion des Fluoreszenzlichts an der Küvette. f_{AE} ist ein Korrekturfaktor, der die Reabsorption und Reemission im Farbstoff berücksichtigt (siehe unten).

Durch Einsetzen von Gl. (C.5) in Gl. (C.4) erhält man

$$E(\lambda) = \frac{S_e(\lambda) f_{AE}(\lambda)}{\int S_{e,R}(\lambda) f_{AE,R}(\lambda) d\lambda} \frac{n_{F,R}^2}{n_F^2} \frac{1 - R_{F,R}}{1 - R_F} \frac{(1 - R_{L,R})(1 - T_{L,R})[1 - R_L(1 - T_L)]}{(1 - R_L)(1 - T_L)[1 - R_{L,R}(1 - T_{L,R})]} \phi_R. \quad (\text{C.6})$$

Transfer-Funktion

Auf Grund der spektralen Eigenschaften des Spektrometers T_{SP} durch das Reflexionsvermögen des Gitters sowie der spektralen Empfindlichkeit des Detektors S_{CCD} , unterscheidet sich das vom Detektor gemessene Fluoreszenzsignal $S_m(\lambda)$ (counts/nm) vom wahren Fluoreszenzsignal $S_e(\lambda)$ ausserhalb der Probe durch

$$S_m(\lambda) = S_e(\lambda) T F(\lambda). \quad (\text{C.7})$$

Dabei wird $T F(\lambda) = T_{SP}(\lambda) \cdot S_{CCD}(\lambda)$ als Transfer-Funktion des Messsystems bezeichnet.

Die Wellenlängenabhängigkeit von $T F(\lambda)$ kann durch Vergleich der gemessenen, spektralen Verteilung $S_{m,lamp}(\lambda)$ einer Halogen-Projektorlampe mit bekannter Farbtemperatur ϑ_F und der theoretisch zu erwartenden Emissionsverteilung (Planck-Formel) ermittelt werden [HW67, Neu69]. Es gilt

$$T F(\lambda) = \gamma S_{m,lamp}(\lambda) / \psi(\lambda, \vartheta_F). \quad (\text{C.8})$$

γ ist ein konstanter Faktor. Für die Plancksche Emissionsformel pro Einheitsfläche, Zeitintervall und Wellenlänge (Photonen/nm cm² s) gilt

$$\psi(\lambda, \vartheta_F) = \frac{2\pi c_0}{\lambda^4 [\exp(hc_0/k_B \lambda \vartheta_F) - 1]} . \quad (\text{C.9})$$

$c_0 = 3 \times 10^8$ m/s ist die Lichtgeschwindigkeit im Vakuum, $h = 6,626 \times 10^{-34}$ J s das Plancksche Wirkungsquantum und $k_B = 1,38 \times 10^{-23}$ J K⁻¹ die Boltzmann-Konstante.

Die Kalibrierung erfolgte mithilfe einer Halogen-Lampe mit $\vartheta_F = 3450 \pm 10$ K (Osram HLX64625, 10 W, 12 V).

Durch Einsetzen von Gl. (C.7) in Gl. (C.6) erhält man schließlich

$$E(\lambda) = \frac{S_m(\lambda) T F^{-1}(\lambda) f_{AE}(\lambda)}{\int S_{m,R}(\lambda) T F^{-1}(\lambda) f_{AE,R}(\lambda) d\lambda} \frac{n_{F,R}^2}{n_F^2} \frac{1 - R_F}{1 - R_{F,R}} \frac{(1 - R_{L,R})(1 - T_{L,R})[1 - R_L(1 - T_L)]}{(1 - R_L)(1 - T_L)[1 - R_{L,R}(1 - T_{L,R})]} \phi_R \quad (\text{C.10})$$

Reabsorption und Reemission

Durch Überlappung von Absorptions- und Fluoreszenzspektrum kann es in der Probe zu Reabsorption (emittiertes Fluoreszenzlicht wird durch den Farbstoff wieder absorbiert) und Reemission (absorbiertes Fluoreszenzlicht bewirkt eine erneute Emission von Fluoreszenzlicht) kommen.

Wird die Fluoreszenz an der Vorderseite der Probe detektiert [SFS77] lässt sich über den Korrekturfaktor f_{AE} folgendes aussagen: Ohne Reabsorption und Reemission gilt $f_{AE}(\lambda) = 1$. Bei Reabsorption von Fluoreszenzlicht ohne erneute Emission wird f_A angegeben [PL87] mit

$$f_A(\lambda) = \frac{\sigma_L}{\sigma_L + \sigma(\lambda)} \frac{1 - T_L^{[\sigma_L + \sigma(\lambda)]/\sigma_L}}{1 - T_L} . \quad (\text{C.11})$$

$\sigma(\lambda)$ ist der Absorptionsquerschnitt der Farbstofflösung bei der Wellenlänge λ . Im allgemeinen Fall von mehrfacher Reabsorption und Reemission von Fluoreszenzlicht gilt [BP90]

$$S_e(\lambda) = \sum_{i=0}^{\infty} S_e^{(i)}(\lambda) , \quad (\text{C.12})$$

mit

$$S_e^{(i+1)}(\lambda) \approx S_e^{(i)}(\lambda) [1 - f_A(\lambda)] \phi_F \quad (\text{C.13})$$

und

$$S_e^{(0)}(\lambda) = S_i(\lambda) (1 - R_F) (\Delta\Omega/4\pi n_F^2) f_A(\lambda) . \quad (\text{C.14})$$

Gl. (C.14) ist identisch mit Gl. (C.5) für $f_{\text{AE}} = f_{\text{A}}$ (keine Emission durch reabsorbierte Fluoreszenzphotonen). Die geometrische Reihe in Gl. (C.12) ergibt

$$S_{\text{e}}(\lambda) = S_{\text{e}}^{(0)}(\lambda) / \{1 - [1 - f_{\text{A}}(\lambda)]\phi_{\text{F}}\} \quad (\text{C.15})$$

und

$$f_{\text{AE}}(\lambda) = f_{\text{A}}(\lambda) / \{1 - [1 - f_{\text{A}}(\lambda)]\phi_{\text{F}}\} . \quad (\text{C.16})$$

Durch Einsetzen von Gl. (C.16) in Gl. (C.10) erhält man einen impliziten Ausdruck für die Fluoreszenzquantenverteilung $E(\lambda)$ (ϕ auf der rechten Seite), der numerisch gelöst werden kann.

Literaturverzeichnis

- [AHD94] Abels C, Heil P, Dellian M, Kuhnle GEH, Baumgartner R, Goetz AE. *In vivo kinetics and spectra of 5-aminolevulinic acid-induced fluorescence in an amelanotic melanoma of the hamster*. Br J Cancer (1994) 70:826-33
- [AKB98] Abels C, Karrer S, Bäumler W, Goetz AE, Landthaler M, Szeimies RM. *Indocyanine green and laser light for the treatment of AIDS-associated cutaneous Kaposi's sarcoma*. Br J Cancer (1998) 77:1021-4
- [Ack97] Ackermann G. *Quantitative Bildauswertung und Modellsimulationen zur in vivo-Kinetik der 5-ALA-induzierten Fluoreszenz in Tumoren der Haut*. Diplomarbeit an der Universität Regensburg (1997)
- [AAB98] Ackermann G, Abels C, Bäumler W, Langer S, Landthaler M, Lang EW, Szeimies RM. *Simulations on the selectivity of 5-aminolaevulinic acid-induced fluorescence in vivo*. J Photochem Photobiol [B] (1998) 47:121-8
- [AAK00] Ackermann G, Abels C, Karrer S, Bäumler W, Landthaler M, Szeimies RM. *Fluoreszenzgestützte Biopsie von Basalzellkarzinomen*. Hautarzt (2000) 51:920-4
- [AHP80] Anderson RR, Hu J, Parrish JA. *Optical radiation transfer in the human skin and application in in vivo remittance spectroscopy*. Proceedings of the Symposium on Bioengineering and the Skin, Cardiff, Wales, July 19–21 1979, MTP Press, London (1980)
- [AP81] Anderson RR, Parrish JA. *The optics of human skin*. J Invest Dermatol (1981) 77:13-9
- [AP82] Anderson RR, Parrish JA. *Optical properties of human skin*. In: Regan JF, Parrish JA (eds). *The science of photomedicine*. Plenum Press, New York (1982) p.147-94

- [ACC00] Andersson-Engels S, Canti G, Cubeddu R, Eker C, af Klinteberg C, Pifferi A, Svanberg K, Svanberg S, Taroni P, Valentini G, Wang I. *Preliminary evaluation of two fluorescence imaging methods for the detection and the delineation of basal cell carcinomas of the skin*. Lasers Surg Med (2000) 26:76-82
- [AJS90a] Andersson-Engels S, Johanson J, Stenram U, Svanberg K, Svanberg S. *Malignant tumor and atherosclerotic plaque diagnosis using laser-induced fluorescence*. IEEE J Quantum Electron (1990) 26:2207-17
- [AJS90b] Andersson-Engels S, Johanson J, Svanberg S. *The use of time-resolved fluorescence for the diagnosis of atherosclerotic plaque and malignant tumours*. Spectrochim Acta Part A Mol Spectrosc (1990) 46:1203-10
- [AKS97] Andersson-Engels S, af Klinteberg C, Svanberg K, Svanberg S. *In vivo fluorescence imaging for tissue diagnostics*. Phys Med Biol (1997) 42:815-24
- [ABM88] Andreola S, Bertoni A, Marchesini R, Melloni E. *Evaluation of optical characteristics of different human tissues in vitro*. Lasers Surg Med (1988) 8:142 (abstract)
- [AEC96] Anidjar M, Ettori D, Cussenot O, Meria P, Desgrandchamps F, Cortesse A, Teillac P, Le-Duc A, Avrillier S. *Laser-induced autofluorescence diagnosis of bladder tumors: dependence on the excitation wavelength*. J Urol (1996) 156:1590-6
- [AEG81] Asaishi K, Endrich B, Goetz AE, Meßmer K. *Quantitative analysis of microvascular structure and function in the amelanotic melanoma A-Mel-3*. Cancer Res (1981) 41:1898-1904
- [Atk65] Atkins JT. *Absorption and scattering of light in turbid media*. Ph.D. dissertation, University Delaware (1965)
- [AP90] Aubrecht J, Perlik F. *[The effect of the method of detecting indocyanine green (HPLC, spectrophotometry) on the determination of pharmacokinetic parameters.]* Cesk Farm (1990) 39:155-7
- [AB42] Auler H, Banzer G. *Untersuchungen über die Rolle der Porphyrine bei geschwulstkranken Menschen und Tieren*. Z Krebsforsch (1942) 53:65-8
- [Bak66] Baker KJ. *Binding of sulfobromophthalein (BSP) sodium and indocyanine green (ICG) by plasma α_1 lipoproteins*. Proc Soc Exp Biol Med (1966) 122:957-63

- [Bat93] Batlle AM del C. *Porphyrins, porphyrias, cancer and photodynamic therapy - a model for cancerogenesis*. J Photochem Photobiol [B] (1993) 20:5-22
- [BMH89] Bauer LA, Murray K, Horn JR, Opheim K, Olsen J. *Influence of nifedipine therapy on indocyanine green and oral propranolol pharmacokinetics*. Eur J Clin Pharmacol (1989) 37:257-60
- [BAK99] Bäuml W, Abels C, Karrer S, Weiß T, Messmann H, Landthaler M, Szeimies RM. *Photo-oxidative killing of human colonic cancer cells using indocyanine green and infrared light*. Br J Cancer (1999) 80:360-3
- [BP90] Bäuml W, Penzkofer A. *Fluorescence spectroscopic analysis of N and P isomers of DODCI*. Chem Phys (1990) 140:75-97
- [BL] Bausch and Lomb. *Refractive index and percent dissolved solids scale*. Analytic Systems Division (S-5195 0675)
- [BD90] Becton & Dickinson. *Cardio-Green*. Product information sheet, Cockeysville, USA (1990)
- [BK78] Benson RC, Kues HA. *Fluorescence properties of indocyanine green as related to angiography*. Phys Med Biol (1978) 23:159-163
- [BQB89] Benya R, Quintata J, Brundage B. *Adverse reactions to indocyanine green: a case report and a review of the literature*. Cathet Cardiovasc Diagn (1989) 17:231-233
- [BS87] Bergmann L, Schaefer C. *Lehrbuch der Experimentalphysik, Band III – Optik*. Verlag Walter de Gruyter, Berlin (1987)
- [BN56] Berlin NI, Neuberger A. *The metabolism of δ -aminolaevulinic acid: 1. Normal pathways studied with the aid of ^{15}N* . Biochem J (1956) 64:80-90
- [BD63] Birks JB, Dyson DJ. Proc R Soc London Ser A (1963) 275:135
- [BW89] de Boer S, Wiersma DA. *Optical dynamics of exciton and polaron formation in molecular aggregates*. Chem Phys (1989) 131:135-44
- [BPT89] Bolin FP, Preuss LE, Taylor RC, Ference RJ. *Refractive index of some mammalian tissues*. Appl Opt (1989) 28:2297-303
- [Bou86] Boulnois JL. *Photophysical processes in recent medical laser developments: a review*. Lasers Med Sci (1986) 1:47-66

- [BB68] Bradley EC, Barr JW. *Determination of blood volume using indocyanine green (cardio-green) dye*. Life Sci (1968) 7:1001-7
- [Bro55] Brooker LG. *Some recent developments in the chemistry of photographic sensitizing dyes*. Experientia (1955) Suppl 2:229-57
- [BL84] Bruls WAG, van der Leun JC. *Forward scattering properties of human epidermal layers*. Photochem Photobiol (1984) 40:231-42
- [CVJ78] Cannistraro S, van de Vorst A, Jori G. *EPR studies on singlet oxygen production by porphyrins*. J Photochem Photobiol [B] (1978) 28:257-9
- [CPN95] Chadwick CA, Potten CS, Nikaido O, Matsunaga T, Proby C, Young AR. *The detection of cyclobutane thymine dimers, (6-4) photolesions and the Dewar photoisomers in sections of UV-irradiated human skin using specific antibodies, and the demonstration of depth penetration effects*. J Photochem Photobiol [B] (1995) 28:163-70
- [CKH93] Chance B, Kang K, He L, Weng J, Sevick E. *Highly sensitive object location in tissue models with linear in-phase and anti-phase multi-element optical arrays in one and two dimensions [published erratum appears in Proc Natl Acad Sci USA (1995) 92:4074]*. Proc Natl Acad Sci USA (1993) 90:3423-7
- [CPW90] Cheong WF, Prahl SA, Welch AJ. *A review of the optical properties of biological tissues*. IEEE J Quantum Electron (1990) 26:2166-85
- [CSL60] Cherrick GR, Stein SW, Leevy CM, Davidson CS. *Indocyanine green: observations on its physical properties, plasma decay, and hepatic extraction*. J Clin Invest (1960) 39:592-600
- [CSV96] Cothren RM, Sivak MV (Jr), van Dam J, Petras RE, Fitzmaurice M, Crawford JM, Wu J, Brennan JF, Rava RP, Manoharan R, Feld S. *Detection of dysplasia at colonoscopy using laser-induced fluorescence: a blinded study*. Gastrointest Endosc (1996) 44:168-76
- [CB76] Craandijk A, van Beek CA. *Indocyanine green fluorescence angiography of the choroid*. Br J Ophthalmol (1976) 60:377-85
- [CCP97] Cubeddu R, Canti G, Pifferi A, Taroni P, Valentini G. *Fluorescence lifetime imaging of experimental tumors in hematoporphyrin derivative-sensitized mice*. Photochem Photobiol (1997) 66:229-36

- [CCT93] Cubeddu R, Canti G, Taroni P, Valentini G. *Time-gated fluorescence imaging for the diagnosis of tumors in a murine model*. Photochem Photobiol (1993) 57:480-5
- [CPT95] Cubeddu R, Pifferi A, Taroni P, Valentini G, Canti G. *Tumor detection in mice by measurement of fluorescence decay time matrices*. Opt Lett (1995) 20:2553-5
- [CKS92] Czarnetzki B, Kerl H, Sterry W (Hrsg.). *Dermatologie und Venerologie*. Verlag Walter de Gruyter, Berlin (1992)
- [Dan69] Daniels F. In: Urbach F (ed). *The biologic effects of ultraviolet radiation*. Pergamon Press, Oxford (1969) p.151-7
- [DFF92] DeCoste SD, Farinelli W, Flotte T, Anderson RR. *Dye-enhanced laser welding for skin closure*. Lasers Surg Med (1992) 12:25-32
- [Dif83] Diffey BL. *A mathematical model for ultraviolet optics in skin*. Phys Med Biol (1983) 28:647-57
- [DM87] Dorn HP, Müller A. *Scheibe-aggregates of pseudoisocyanine in solution and in molecular monolayers. I. Fluorescence lifetimes measured with the aid of a distributed feedback dye laser and a streak camera*. Appl Phys (1987) B43:167-72
- [Duc90] Duck FA. *Physical properties of tissue: a comprehensive reference book*. Academic Press, San Diego (1990)
- [EKS98] Ebert B, Kohl M, Sukowski U, Rinneberg H, Winter H, Bellmann KP, Audring H. *Fluorescence imaging of cutaneous malignant melanomas and naevi*. Lasers Med Sci (1998) 13:204-208
- [Eld94] Elder GH. *The porphyrias*. In: Holton JB (ed). *The inherited metabolic disorders*. Churchill Livingstone, London (1994) p.351-78
- [EAG80] Endrich B, Asaishi K, Goetz AE, Meßmer K. *Technical report: A new chamber technique for microvascular studies in unanaesthetized hamsters*. Res Exp Med (1980) 177:125-34
- [EAB61] Everett MA, Anglin JH, Bever AT. *Ultraviolet-induced biochemical alterations in skin*. Arch Dermatol (1961) 84:717-24
- [EYS66] Everett MA, Yeagers E, Sayre RM, Olsen RL. *Penetration of epidermis by ultraviolet rays*. Photochem Photobiol (1966) 5:533-42

- [FDB81] Feather JW, Dawson JB, Barker DJ, Cotterill JA. In: Marks R, Payne PA (eds). *Bioengineering and the skin*. MTP Press, Lancaster (1981) p.275-81
- [FWM48] Figge F, Weliland G, Mangeniello L. *Cancer detection and therapy. Affinity of neoplastic, embryonic and traumatized regenerating tissues for porphyrins and metalloporphyrins*. Proc Soc Exptl Biol Med (1948) 68:640-1
- [FKT77] Fink F, Klose E, Teuchner K, Dähne S. *Determination of the fluorescence decay time of the I aggregates of pseudoisocyanine*. Chem Phys Lett (1977) 45:548-9
- [FMG95] Fisher AM, Murphree AL, Gomer CJ. *Clinical and preclinical photodynamic therapy*. Lasers Surg Med (1995) 17:2-31
- [FFP91] Fleishaker JC, Friedman H, Pollock SR. *Extent and variability of the first-pass elimination of adinazolam mesylate in healthy male volunteers*. Pharm Res (1991) 8:162-7
- [Fle85] Fleming GR. *Chemical applications of ultrafast spectroscopy*. Oxford University Press, New York (1985) p.93
- [FH76] Flower RW, Hochheimer BF. *Indocyanine green dye fluorescence and infrared absorption choroidal angiography performed simultaneously with fluorescein angiography*. Johns Hopkins Med J (1976) 138:33-42
- [Foo68] Foote CS, *Mechanisms of photosensitized oxidation*. Science (1968) 162:963-70
- [For51] Förster T. *Fluoreszenz Organischer Verbindungen*. Vandenkoeck und Ruprecht, Göttingen (1951)
- [For86] Förster T. In: Sinanoglu O (ed). *Modern quantum chemistry (part III)*. Academic Press, New York (1986)
- [FBH57] Fox IJ, Brooker LG, Heseltine DW, Essex HE, Wood EH. *A tricarbo-cyanine dye for continuous recording of dilution curves in whole blood independent of variations in blood oxygen saturation*. Proc Mayo Clin (1957) 32:478
- [FBH56] Fox IJ, Brooker LG, Heseltine DW, Wood EH. *A new dye for continuous recording of dilution curves in whole blood independent of variations in blood oxygen saturation*. Circulation (1956) 14:937-8
- [FW60] Fox IJ, Wood EH. *Indocyanine green: physical and physiologic properties*. Mayo Clin Proc (1960) 35:732-44

- [FVH96] Frisch C, Vocks E, Herzog M, Vogt HJ, Borelli S, *Persistierende Photosensibilisierung - eine Verlaufsbeobachtung nach i.v.-PDT*. Akt Dermatol (1996) 22:98-103
- [FAG97] Fritsch C, Abels C, Goetz AE, Stahl W, Bolsen K, Ruzicka T, Goerz G, Sies H. *Porphyrins preferentially accumulate in a melanoma following intravenous injection of 5-aminolevulinic acid*. Biol Chem (1997) 378:51-7
- [FBM97] Fritsch C, Becker-Wegerich PM, Menke H, Ruzicka T, Goerz G, Olbrisch RR. *Successful surgery of multiple recurrent basal cell carcinoma guided by photodynamic diagnosis*. Aesth Plast Surg (1997) 21:437-9
- [FBS96] Fritsch C, Becker-Wegerich PM, Schulte KW, Neuse W, Lehmann P, Ruzicka T, Goerz G. *[Photodynamic therapy and breast-plasty of a extensive superficial trunk skin basalioma of the breast. An effective combination therapy with photodynamic diagnosis]*. Hautarzt (1996) 47:438-42
- [FLS99] Fritsch C, Lehmann P, Stahl W, Schulte KW, Blohm E, Lang K, Sies H, Ruzicka T. *Optimum porphyrin accumulation in epithelial skin tumours and psoriatic lesions after topical application of δ -aminolaevulinic acid*. Br J Cancer (1999) 79:1603-8
- [FVB96] Fritsch C, Verwohlt B, Bolsen K, Ruzicka T, Goerz G. *Influence of topical photodynamic therapy with 5-aminolevulinic acid on porphyrin metabolism*. Arch Dermatol Res (1996) 288:517-21
- [Fri98] Fritsch P. *Dermatologie und Venerologie*. Springer-Verlag, Berlin (1998)
- [GDP91] Gadonas R, Danielius R, Pelakauskas A, Sundström V, Gilbro T. In: Piskarkas A (ed). *Lasers and ultrafast processes*. Vilnius University Press, Vilnius (1991) p.230ff
- [GGL94] Gagel R, Gadonas R, Laubereau A. *Evidence for biexcitons and dynamic Stark effect in J-aggregates from femtosecond spectroscopy*. Chem Phys Lett (1994) 217:228-33
- [GSN70] Gathje J, Steuer RR, Nicholes KR. *Stability studies on indocyanine green dye*. J Appl Physiol (1970) 29:181-5
- [GJS89] van Gemert MJC, Jacques SL, Sterenborg HJCM, Star WM. *Skin optics*. IEEE Trans Biomed Eng (1989) 36:1146-54

- [GRM88] Gomer CJ, Rucker N, Murphree AL. *Differential cell photosensitivity following porphyrin photodynamic therapy*. Cancer Res (1988) 48:4539-42
- [GR92] Goreman AA, Rogers MAJ. *Current perspectives singulet oxygen detection in biological environmets*. J Photochem Photobiol [B] (1992) 14:159-76
- [GSN84] Gottlieb ME, Stratton HH, Newell JC, Shah DM. *Indocyanine green. Its use as an early indicator of hepatic dysfunction following injury in man*. Arch Surg (1984) 119:264-8
- [Gou78] Gouterman M. *Optical spectra and electric structure of porphyrins and related rings*. In: Dolphin D (ed). *The porphyrins*. Vol. 3, Academic Press, New York (1978) p.1-165
- [GAZ92] Graaff R, Aarnoudse JG, Zijp JR, Sloot PMA, de Mul FFM, Greve J, Koelink MH. *Reduced light-scattering properties for mixtures of spherical particles: a simple approximation derived from Mie calculations*. Appl Opt (1992) 31:1370-6
- [GDK93] Graaff R, Dassel ACM, Koelink MH, de Mul FFM, Aarnoudse JG, Zijlstra WG. *Optical properties of human dermis in vitro and in vitro*. Appl Opt (1993) 32:435-47
- [Gro94] Großweiner LI. *The science of phototherapy*. CRC Press, London (1994)
- [Gui73] Guilbault GG. *Practical fluorescence: theory, methods and techniques*. Marcel Dekker, New York (1973) p.664
- [GTR00] Gurfinkel M, Thompson AB, Ralston W, Troy TL, Moore AL, Moore TA, Gust JD, Tatman D, Reynolds JS, Muggenburg B, Nikula K, Pandey R, Mayer RH, Hawrysz DJ, Sevic-Muraca EM. *Pharmacokinetics of ICG and HPPH-car for the detection of normal and tumor tissue using fluorescence, near-infrared reflectance imaging: a case study*. Photochem Photobiol (2000) 72:94-102
- [HLB84] Haina D, Landthaler M, Braun-Falko O, Waidelich W. *Optische Eigenschaften menschlicher Haut*. In: Waidelich W (ed). *Laser-Optoelektronik in der Medizin*. Springer-Verlag, Berlin (1984) p.187-93
- [HW93] Haken H, Wolf HC. *Atom- und Quantenphysik*. Springer-Verlag, Berlin (1993)
- [HH86] Haneda K, Horiuchi T. *A method for measurement of total circulating blood volume using indocyanine green*. Tohoku J Exp Med (1986) 148:49-56

- [HHM56] Hardy JD, Hammel HT, Murgatroyd D. *Spectral transmittance and reflectance of excised human skin*. J Appl Physiol (1956) 9:257-64
- [HLM95] Harries ML, Lam S, MacAulay C, Qu J, Palcic B. *Diagnostic imaging of the larynx: autofluorescence of laryngeal tumours using the helium-cadmium laser*. J Laryngol Otol (1995) 109:108-10
- [HW87] Harris DM, Werkhaven J. *Endogenous porphyrin fluorescence in tumors*. Lasers Surg Med (1987) 7:467-72
- [HSH99] Häußinger K, Stanzel F, Huber RM, Pichler J, Stepp H. *Autofluorescence detection of bronchial tumors with the D-Light/AF*. Diagnostic and Therapeutic Endoscopy (1999) 5:105-12
- [Hec89] Hecht E. *Optik*. Addison-Wesley, London (1989)
- [HSS86] Heintz R, Svensson CK, Stoeckel K, Powers GJ. *Indocyanine green: pharmacokinetics in the rabbit and relevant studies of its stability and purity*. J Pharm Sci (1986) 75:398-402
- [HG41] Henyey LG, Greenstein JL. *Diffuse radiation in the galaxy*. Astrophys J (1941) 93:70-83
- [Her77] Herz AH. Adv Colloid Interface Sci (1977) 8:237
- [HNH87] Hollins B, Noe B, Henderson JM. *Fluorometric determination of indocyanine green in plasma*. Clin Chem (1987) 33:765-8
- [HMP98] Holzer W, Mauerer M, Penzkofer A, Szeimies RM, Abels C, Landthaler M, Bäuml W. *Photostability and thermal stability of indocyanine green*. J Photochem Photobiol [B] (1998) 47:155-64
- [HYG94] Hope-Ross M, Yannuzzi LA, Gragoudas ES, Guyer DR, Slakter JS, Sorenson JA, Krupsky S, Orlock DA, Puliafito CA. *Adverse reactions due to indocyanine green*. Ophthalmology (1994) 101:529-533
- [HW67] Hoppmann H, Wuttke KE. Tech Wiss Abh Osram Ges (1967) 9:137
- [Hul80] van de Hulst HC. *Multiple light scattering: tables, formulas and applications*. Vol. 2, Academic Press, New York (1980)
- [INO90] Imasaka T, Nakagawa H, Okazaki T, Ishibashi N. *Enzyme immunoassay of insulin by semiconductor laser fluorometry*. Anal Chem (1990) 62:2404-5

- [IOI88] Imasaka T, Okazaki T, Ishibashi N. *Anal Chim Acta* (1988) 208:325
- [Jac96] Jacques SL. *Origin of tissue optical properties in the UVA, visible and NIR Regions*. In: *OSA Tops on Advances in Optical Imaging and Photon Migration*. Vol. 2 (1996) xii+406:364-71
- [JAP87] Jacques SL, Alter CA, Prahl SA. *Angular dependence of He-Ne laser light scattering of human dermis*. *Lasers Life Sci* (1987) 1:309-33
- [JJG93] Jacques SL, Joseph R, Gofstein G. *How photobleaching affects dosimetry and fluorescence monitoring of PDT in turbid media*. *SPIE* (1993) 1881:170
- [JK91] Jacques SL, Keijzer M. *Dosimetry for lasers and light in dermatology: Monte Carlo simulations of 577-nm pulsed laser penetration into cutaneous vessels*. *SPIE* (1991) 1422:2-13
- [JP87] Jacques SL, Prahl SA. *Modelling optical and thermal distribution in tissue during laser irradiation*. *Lasers Surg Med* (1987) 6:494-503
- [JHM56] Jacquez JA, Huss J, McKeehan W, Dimitroff JM, Kuppenheim HF. *Spectral reflectance of human skin in the region 0.7-2.6 μ* . *J Appl Physiol* (1956) 8:297-9
- [Jai87] Jain RK. *Transport of molecules in tumor interstitium: a review*. *Cancer Res* (1987) 47:3039-3051
- [Jel36] Jelley EE. *Spectral absorption and fluorescence of dyes in the molecular state*. *Nature* (1936) 138:1009-10
- [JFM97] Jichlinski P, Forrer M, Mizeret J, Glanzmann T, Braichotte D, Wagnieres G, Zimmer G, Guillou L, Schmidlin F, Graber P, van den Bergh H, Leisinger HJ. *Clinical evaluation of a method for detecting superficial surgical transitional cell carcinoma of the bladder by light-induced fluorescence of protoporphyrin IX following the topical application of 5-aminolevulinic acid: preliminary results*. *Lasers Surg Med* (1997) 20:402-8
- [JDM82] Johnson GD, Davidson RS, McNamee KC, Russel G, Goodwin D, Holborow EJ. *Fading of immunofluorescence during microscopy: a study of the phenomenon and its remedy*. *J Immunolog Meth* (1982) 55:231-242
- [Jor80] Jori G. *The molecular biology of photodynamic action*. In: Pratesi R, Sacchi CA (eds). *Lasers in Photomedicine and Photobiology*. Springer-Verlag, New York (1984)

- [Jun98] Jung EG (Hrsg.). *Dermatologie*. Hippokrates-Verlag, Stuttgart (1989)
- [KZ65] van Kampen EJ, Zijlstra WG. *Determination of hemoglobin and its derivatives*. Adv Clin Chem (1965) 8:141-87
- [KSG89] Kappas A, Sassa S, Galbraith RA, Nordmann Y. *The Porphyrrias*. In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D (eds). *The metabolic basis of inherited disease*. McGraw-Hill, New York (1989) p.1305-66
- [Kas50] Kasha M. Disc Faraday Soc (1959) 9:14
- [KCN95] Kavanagh G, Crosby J, Norval M. *Urocanic acid isomers in human skin: analysis of site of variation*. Br J Dermatol (1995) 133:728-31
- [KSI85] Kawasaki S, Sugiyama Y, Iga T, Hanano M, Sanjo K, Beppu T, Idezuki Y. *Pharmacokinetic study on the hepatic uptake of indocyanine green in cirrhotic patients*. Am J Gastroenterol (1985) 80:801-6
- [KP92] Kennedy JC, Pottier RH. *Endogenous protoporphyrin IX, a clinically useful photosensitizer for photodynamic therapy*. J Photochem Photobiol [B] (1992) 14:275-92
- [KPP90] Kennedy JC, Pottier RH, Pross DC. *Photodynamic therapy with endogenous protoporphyrin IX: basic principles and present clinical experience*. J Photochem Photobiol [B] (1990) 6:143-8
- [Kes86] Kessel D. *Porphyrin-lipoprotein association as a factor in porphyrin localisation*. Cancer Lett (1986) 33:183-6
- [KHJ75] Ketley JN, Habig WH, Jakoby WB. *Binding of nonsubstrate ligands to the glutathione S-transferases*. J Biol Chem (1975) 250:8670-3
- [KGK68] Klocke FJ, Greene DG, Koberstein RC. *Indicator-dilution measurement of cardiac output with dissolved hydrogen*. Circ Res (1968) 22:841-53
- [KMA96] Koenig F, McGovern FJ, Althausen AF, Deutsch TF, Schomacker KT. *Laser induced autofluorescence diagnosis of bladder cancer [see comments]*. J Urol (1996) 156:1597-601
- [KDW99] Kolarova H, Ditrichova D, Wagner J. *Penetration of the laser Light into the skin in vitro*. Lasers Surg Med (1999) 24:231-5

- [KK82] Kopainsky B, Kaiser W. *Ultrafast transient processes of monomers, dimers, and aggregates of pseudoisocyanine chloride (PIC)*. Chem Phys Lett (1982) 88:357-61
- [KBH92] Kriegmair M, Baumgartner R, Hofstetter AG. *Intravesikale Instillation von Delta-Aminolävulinsäure (ALA) – Eine neue Methode zur photodynamischen Diagnostik und Therapie*. Laser Med (1992) 8:83
- [KBK94] Kriegmair M, Baumgartner R, Knüchel R, Ehsan A, Steinbach P, Lumper W, Hofstädter F, Hofstetter AG. *[Photodynamic diagnosis of urothelial neoplasms after intravesicular instillation of 5-aminolevulinic acid]*. Urologe [A] (1994) 33:270-5
- [KBK96] Kriegmair M, Baumgartner R, Knüchel R, Stepp H, Hofstädter F, Hofstetter AG. *Detection of early bladder cancer by 5-aminolevulinic acid induced porphyrin fluorescence [see comments]*. J Urol (1996) 155:105-9; discussion 109-10
- [Kri98] Kriegmair M, Mitglieder der AFE-Studiengruppe. *Die transurethrale Elektresektion von Harnblasentumoren mit und ohne 5-Aminolävulinsäure induzierter Fluoreszenz-Endoskopie*. Urologe [A] (1998) 37:S15
- [KH52] Kuppenheim HF, Heer RR Jr. *Spectral reflectance of white and Negro skin between 400 and 1000 mμ*. J Appl Physiol (1952) 4:800-6
- [LLP96] Laihia J, Lemmetyinen H, Pasanen P, Jansen CT. *Establishment of a kinetic model for urocanic acid photoisomerization*. J Photochem Photobiol [B] (1996) 33:211-7
- [LB96] Lam S, Becker HD. *Future diagnostic procedures*. Thorac Endosc (1996) 6:363-79
- [LMH93] Lam S, MacAulay C, Hung J, LeRiche J, Profio AE, Palcic B. *Detection of dysplasia and carcinoma in situ with a lung imaging fluorescence endoscope device*. J Thorac Cardiovasc Surg (1993) 105:1035-40
- [LKM76] Landsman ML, Kwant G, Mook GA, Zijlstra WG. *Light-absorbing properties, stability, and spectral stabilization of indocyanine green*. J Appl Physiol (1976) 40:575-83
- [LRS93] Landthaler M, Rück A, Szeimies RM, *[Photodynamic therapy of skin tumors.] Hautarzt (1993) 44:69-74*

- [LAB97] Langer S, Abels C, Botzlar A, Rick K, Baumgartner R, Szeimies RM, Goetz AE. *Kinetics and spectra of aminolaevulinic acid-induced fluorescence in tumor and host tissue after topical application in vivo*. Br J Cancer (199...)
- [LLH79] Leevy CM, Leevy CB, Howard MM. In: Davidson C (ed). *Problems in liver diseases*. Thieme-Verlag, Stuttgart (1979) p.42
- [LSL67] Leevy CM, Smith F, Longueville J, Paumgartner G, Howard MM. *Indocyanine green clearance as a test for hepatic function. Evaluation by dichromatic ear densitometry*. JAMA (1967) 200:236-40
- [Leo99] Leonhard M. *New incoherent autofluorescence/fluorescence system for early detection of lung cancer*. Diagnostic and Therapeutic Endoscopy (1999) 5:71-5
- [LRS96] Leunig A, Rick K, Stepp H, Gutmann R, Alwin G, Baumgartner R, Feyh J. *Fluorescence imaging and spectroscopy of 5-aminolevulinic acid induced protoporphyrin IX for the detection of neoplastic lesions in the oral cavity*. Am J Surg (1996) 172:674-7
- [LKF00] Libsch G, Klimant I, Frank B, Holst G, Wolfbeis OS. *Luminescence lifetime imaging of oxygen pH, and carbon dioxide distribution using optical sensors*. Appl Spectrosc (2000) 54:548
- [LOC91] Libutti SK, Oz MC, Chuck RS, Auteri JS, Treat MR, Nowygrod R. *A preliminary study of dye-enhanced laser photosclerosis*. Surgery (1991) 109:163-8
- [Lin91] Lin C. *Photodynamic therapy of malignant tumors - recent developments*. Cancer Cells (1991) 3:437-44
- [LBO61] Lipson RL, Baldes EJ, Olsen AM. *The use of a derivate of hematoporphyrin in tumor detection*. J Natl Cancer Inst (1961) 26:1-11
- [LP86] Lu Y, Penzkofer A. *Absorption behaviour of methanolic rhodamine 6G solutions at high concentration*. Chem Phys (1986) 107:175-84
- [Luc30] Lucas NS. *The permeability of human epidermis to ultraviolet radiation*. Biochem J (1930) 25:57-70
- [MBP89] MacRoberts AJ, Bown SG, Phillips D. *What are the ideal photoproperties for a sensitizer?* In: Bock G, Harnett S (eds). *Photosensitizing compounds: their chemistry, biology and clinical use*. John Wiley & Sons, Chichester (1989) p.4-16

- [MKR95] Malik Z, Kostenich G, Roitman L, Ehrenberg B, Orenstein A. *Topical application of 5-aminolevulinic acid, DMSO and EDTA: protoporphyrin IX accumulation in skin and tumours of mice*. J Photochem Photobiol [B] (1995) 28:213-8
- [ML87] Malik Z, Lugaci H. *Destruction of erythroleukaemic cells by photoactivation of endogenous porphyrins*. Br J Cancer (1987) 56:589-95
- [MBA89] Marchesini R, Bertoni A, Andreola S, Melloni E, Sichirollo AE. *Extinction and absorption coefficients and scattering phase functions of human tissues in vitro*. Appl Opt (1989) 28:2318-24
- [MCP92] Marchesini R, Clemente C, Pignoli E, Brambilla M. *Optical properties of in vitro epidermis and their possible relationship with optical properties of in vivo skin*. J Photochem Photobiol [B] (1992) 16:127-40
- [MJ94] Martin GR, Jain RK. *Noninvasive measurement of interstitial pH profiles in normal and neoplastic tissue using fluorescence ratio imaging microscopy*. Cancer Res (1994) 54:5670-4
- [MNC88] Mayevsky A, Nioka S, Chance B. *Fiberoptic surface fluorometry reflectometry and 31-p-NMR for monitoring the intracellular energy state in vivo*. Adv Exp Med Biol (1988) 222:365-74
- [MBA01] Mies C, Bauer C, Ackermann G, Bäumler W, Abels C, Szeimies RM, Lang EW. *Classification of skin cancer and benign lesions using independent component analysis*. NAISO on informatical science inovations, Dubay (2001) in press
- [MTM94] Minoshima K, Taiji M, Misawa K, Kobayashi T. *Femtosecond nonlinear optical dynamics of excitons in J-aggregates*. Chem Phys Lett (1994) 218:67-72
- [MK93] Mitchell DL, Karentz D. *The induction and repair of DNA photodamage in the environment*. In: Young AR (ed). *Environmental UV Photobiology*. Plenum Press, New York (1993) p.345-77
- [MR87] Mitchell DL, Rosenstein BS. *The use of specific radioimunoassays to determine the actions spectra for the photolysis of (6-4) photoproducts*. Photochem Photobiol (1987) 45:781-6
- [Mob95] Möbius D. Adv Mater (1995) 7:437
- [Muc76] Muckle TJ. *Plasma protein binding of indocyanine green*. Biochem Med (1976) 15:17-21

- [NM65] Nelder JA, Mead R. *Comput J* (1965) 7:308
- [Neu69] Neumann GM. *Operating laws of the halogen incandescent lamp*. *Lichttechnik* (1969) 21:63A-5A
- [OKR98] Orenstein A, Kostenich G, Rothmann C, Barshack I, Malik Z. *Imaging of human skin lesions using multipixel fourier transform spectroscopy*. *Lasers Med Sci* (1998) 13:112-8
- [Ott98] Ott P. *Hepatic Elimination of indocyanine green with special reference to distribution kinetics and the influence of plasma protein binding*. *Pharmacol Toxicol* (1998) 83 Suppl 2:1-48
- [Owe73] Owen VM. *Estimation of indocyanine green concentrations*. *Clin Biochem* (1973) 6:132-5
- [Par68] Parker CA. *Photoluminescence of solutions*. Elsevier, Amsterdam (1968)
- [PAU78] Parrish JA, Anderson RR, Urbach F, Pitts D. *UV-A: Biologic effects of ultraviolet radiation with emphasis on human response to longwave ultraviolet*. Plenum Press, New York (1978)
- [POS95] Panjehpour M, Overholt BF, Schmidhammer JL, Farris C, Buckley PF, Vo-Dinh T. *Spectroscopic diagnosis of esophageal cancer: new classification model, improved measurement system*. *Gastrointest Endosc* (1995) 41:577-81
- [PAB91] Patonay G, Antoine MD, Boyer AE. *SPIE* (1991) 1435:52
- [PPK70] Paumgartner G, Probst P, Kraines R, Leevy CM. *Kinetics of indocyanine green removal from the blood*. *Ann NY Acad Sci* (1970) 170:134-70
- [PBM97] Peng Q, Berg K, Moan J, Kongshaug M, Nesland JM. *5-Aminolevulinic acid-based photodynamic therapy: principles and experimental research*. *Photochem Photobiol* (1997) 65:235-51
- [PL87] Penzkofer A, Leupacher W. *Fluorescence behaviour of highly concentrated rhodamine 6G solutions*. *J Luminescence* (1987) 37:61-72
- [PWP90] Peters VG, Wyman DR, Patterson MS, Frank GL. *Optical properties of normal and diseased human breast tissue in the visible and near infrared*. *Phys Med Biol* (1990) 35:1317-34
- [PWM71] Peterson OG, Webb JP, McColgin WC, Eberly JH. *J Appl Phys* (1971) 42:1917

- [PPB96] Philip R, Penzkofer A, Bäuml W, Szeimies RM, Abels C. *Absorption and fluorescence spectroscopic investigation of indocyanine green*. J Photochem Photobiol [A] (1996) 96:137-48
- [PK84] Picciolo GL, Kaplan DS. *Reduction of fading of fluorescent reaction product for microphotometric quantitation*. Adv Appl Microbiol (1984) 30:197-234
- [PCP86] Pottier RH, Chow YFA, la Plante JP, Truscott TG, Kennedy JC, Beiner LA. *Non-invasive technique for obtaining fluorescence excitation and emission spectra in vivo*. Photochem Photobiol (1986) 44:679-87
- [PPD95] Pradhan A, Pal P, Durocher G, Villeneuve L, Balassy A, Babai F, Gaboury L, Blanchard L. *Steady-state and time-resolved fluorescence properties of metastatic and non-metastatic malignant cells from different species*. J Photochem Photobiol [B] (1995) 31:101-12
- [Pro92] Prota G. *Melanins and melanogenesis*. Academic Press, San Diego (1992)
- [Psc86] Pschyrembel W. *Klinisches Wörterbuch*. Walter de Gruyter Verlag, Berlin (1986)
- [Ram00] Ramanujam N. *Fluorescence spectroscopy of neoplastic and non-neoplastic tissues (review)*. Neoplasia (2000) 2:89-117
- [Ram97] Ramsauer L. *Fluoreszenzgestützte Erkennung und Charakterisierung von Tumoren der Haut*. Diplomarbeit, Universität Regensburg (1997)
- [RWF55] Rassmussen-Taxdal D, Ward G, Figge F. *Fluorescence of human lymphatic and cancer tissue following doses of intravenous hematoporphyrin*. Cancer (1955) 8:78-81
- [Ray71] Rayleigh Lord (Strutt JW). Phil Mag (1871) 41:107
- [RPD94] Reichel E, Puliafito CA, Duker JS, Guyer DR. *Indocyanine green dye-enhanced diode laser photocoagulation of poorly defined subfoveal choroidal neovascularization*. Ophthalm Surg (1994) 25:195-201
- [RPG97] Reindl S, Penzkofer A, Gong SH, Landthaler M, Szeimies RM, Abels C, Bäuml W. *Quantum yield of triplet formation for indocyanine green*. J Photochem Photobiol [A] (1997) 105:65-68
- [RDG81] Rentsch SK, Danielius RV, Gadonas RA, Piskarskas A. *Picosecond kinetics and transient spectra of pseudoisocyanine monomers and J-aggregates in aqueous solution*. Chem Phys Lett (1981) 84:446-9

- [RGJ95] Ricchelli F, Gobbo S, Jori G, Moreno G, Salet C. *Temperature-induced changes in fluorescence properties as a probe of porphyrin microenvironment in lipid membranes 1. The partition of hematoporphyrin and protoporphyrin in liposomes.* Eur J Biochem (1995) 233:159-64
- [RS96] Richards-Kortum R, Sevick-Muraca E. *Quantitative optical spectroscopy for tissue diagnosis.* Annual Rev Phys Chem (1996) 47:555-606
- [RWM94] Richert C, Wessels JM, Müller M, Kisters M, Benninghaus T, Goetz AE. *Photodynamic antitumor agents: beta-methoxyethyl groups give access to functionalized porphycenes and enhance cellular uptake and activity.* J Med Chem (1994) 37:2797-807
- [RSS97] Rick K, Sroka R, Stepp H, Kriegmair M, Huber RM, Jacob K, Baumgartner R. *Pharmacokinetics of 5-aminolevulinic acid-induced protoporphyrin IX in skin and blood.* J Photochem Photobiol [B] (1997) 40:313-9
- [RFK96] Riesenberger R, Fuchs C, Kriegmair M. *Photodynamic effects of 5-aminolevulinic acid-induced porphyrins on bladder carcinoma cells in vitro.* Eur J Cancer (1996) 32:328-34
- [Rod99] Röder B. *Einführung in die molekulare Photobiophysik.* Teubner-Verlag, Stuttgart (1999)
- [RWP97] Rotermund F, Weigand R, Penzkofer A. *J-aggregation and disaggregation of indocyanine green in water.* Chem Phys (1997) 220:385-92
- [RRK97] Ross EV, Romero R, Kollias N, Crum C, Anderson RR. *Selectivity of protoporphyrin IX fluorescence for condylomata after topical application of 5-aminolaevulinic acid: implications for photodynamic treatment.* Br J Dermatol (1997) 137:736-42
- [Ros92] Rost FWD. *Fluorescence microscopy.* Cambridge University Press (1992)
- [RCD89] Rowe DE, Carroll RJ, Day CL Jr. *Long-term recurrence rates in previously untreated (primary) basal cell carcinoma: implications for patient follow-up.* J Dermatol Surg Oncol (1989) 15:315-28
- [RGH00] Rud E, Gederaas O, Hogset A, Berg K. *5-aminolevulinic acid, but not 5-aminolevulinic acid esters, is transported into adenocarcinoma cells by system BETA transporters.* Photochem Photobiol (2000) 71:640-7
- [Rus95] Russ JC. *The image processing handbook.* CRC Press, London (1995)

- [SJT95] Saidi IS, Jaques SL, Tittel FK. *Mie and Rayleigh modeling of visible-light scattering in neonatal skin*. Appl Opt (1995) 34:7410-18
- [SRH82] Sandberg S, Romslo I, Hovding G, Bjorndal T. *Porphyrin-induced photo-damage as related to the subcellular localisation of the porphyrins*. Acta Derm Venereol (1982) 100:75-80
- [SII86] Sauda K, Imasaka T, Ishibashi N. *Determination of protein in human serum by high-performance liquid chromatography with semiconductor laser fluorometric detection*. Anal Chem (1986) 58:2649-53
- [SHN70] Saunders KB, Hoffman JI, Noble MI, Domenech RJ. *A source of error in measuring flow with indocyanine green*. J Appl Physiol (1970) 28:190-8
- [SBK77] Schad H, Brechtelsbauer H, Kramer K. *Studies on the suitability of a cyanine dye (Viher-Test) for indicator dilution technique and its application to the measurement of pulmonary artery and aortic flow*. Pfluegers Arch (1977) 370:139-44
- [Sch37] Scheibe G. *Über die Veränderlichkeit der Absorptionsspektren in Lösung und die van der Waalschen Kräfte als ihre Ursache*. Angew Chemie (1937) 50:51
- [Sch64] Scheuplein RJ. *A survey of some fundamental aspects of the absorption and reflection of light by tissue*. J Soc Cosmet Chem (1964) 15:111-22
- [SGS97] Schneckenburger H, Gschwend MH, Strauss WS, Sailer R, Kron M, Steeb U, Steiner R. *Energy transfer spectroscopy for measuring mitochondrial metabolism in living cells*. Photochem Photobiol (1997) 66:34-41
- [SFC92] Schomacker KT, Frisoli JK, Compton CC, Flotte TJ, Richter JM, Nishioka NS, Deutsch TF. *Ultraviolet laser-induced fluorescence of colonic tissue: basic biology and diagnostic potential*. Lasers Surg Med (1992) 12:63-78
- [SHS00] Scott MA, Hopper C, Sahota A, Springett R, McIlroy BW, Bown SG, MacRobert AJ. *Fluorescence photodiagnostics and photobleaching studies of cancerous lesions using ratio imaging and spectroscopic techniques*. Lasers Med Sci (2000) 15:63-72
- [SFS77] Selanger KA, Falnes J, Sikkeland T. *Fluorescence lifetime studies of rhodamine 6G in methanol*. J Phys Chem (1977) 81:1960-3

- [STK96] Shinohara H, Tanaka A, Kitai T, Yanabu N, Inomoto T, Satoh S, Hatano E, Yamaoka Y, Hirao K. *Direct measurement of hepatic indocyanine green clearance with near-infrared spectroscopy: separate evaluation of uptake and removal.* Hepatology (1996) 23:137-44
- [SS71] Simmons R, Shephard RJ. *Does indocyanine green obey Beer's law?* J Appl Physiol (1971) 30:502-7
- [SKE98] Simpson CR, Kohl M, Essenpreis M, Cope M. *Near-infrared optical properties of ex vivo human skin and subcutaneous tissues measured using the Monte Carlo inversion technique.* Phys Med Biol (1998) 43:2465-78
- [SMS00] Soini E, Meltola NJ, Soini AE, Soukka J, Soini JT, Hanninen PE. *Two-photon fluorescence excitation in detection of biomolecules.* Biochem Soc Trans (2000) 28:70-4
- [SL77] Solan JL, Laden K. *Factors affecting the penetration of light through stratum corneum.* J Soc Cosmet Chem (1977) 28:125-37
- [SSM88] Sperber P, Spangler W, Meier B, Penzkofer A. *Experimental and theoretical investigation of tunable picosecond pulse generation in longitudinally pumped dye laser generators and amplifiers.* Opt Quant Electron (1988) 20:395-431
- [SBB92] Sroka R, Baumgartner R, Buser A, Ell C, Jocham D, Unsöld E. *Laser-assisted detection of endogenous porphyrins in malignant diseases.* SPIE (1992) 1641:99-106
- [SSB98] Stepp H, Sroka R, Baumgartner R. *Fluorescence endoscopy of gastrointestinal diseases: basic principles, techniques, and clinical experience (review).* Endoscopy (1998) 30:379-86
- [SSF96] Sterenborg HJ, Saarnak AE, Frank R, Motamedi M. *Evaluation of spectral correction techniques for fluorescence measurements on pigmented lesions in vivo.* J Photochem Photobiol [B] (1996) 35:159-65
- [SDT88] Stiel H, Daehne S, Teuchner K. *J-aggregates of pseudoisocyanine in solution: new data from nonlinear spectroscopy.* J Lumin (1988) 39:351-7
- [SB62] Strickler SJ, Berg RA. J Chem Phys (1962) 37:814

- [SSW98] Stummer W, Stocker S, Wagner S, Stepp H, Fritsch C, Goetz C, Goetz AE, Kieffmann R, Reulen HJ. *Intraoperative detection of malignant gliomas by 5-aminolevulinic acid-induced porphyrin fluorescence*. Neurosurgery (1998) 42:518-25; discussion 525-6
- [SGG88] Sundstrom V, Gillbro T, Gadonas RA, Piskarskas A. *Annihilation of singlet excitons in J aggregates of pseudoisocyanine (PIC) studied by pico- and subpicosecond spectroscopy*. J Chem Phys (1988) 89:2754-62
- [SG81] Sutherland JC, Griffin KP. *Absorption spectrum of DNA for wavelengths greater than 300 nm*. Radiat Res (1981) 86:399-409
- [SHB69] Sutterer WF, Hardin SE, Benson RW, Krovetz LJ, Schiebeler GL. *Optical behaviour of indocyanine green dye in blood and in aqueous solution*. Am Heart J (1966) 72:345-9
- [SCK96] Szeimies RM, Calzavara-Pinton RG, Karrer S, Ortel B, Landthaler M. *Topical photodynamic therapy in dermatology*. J Photochem Photobiol [B] (1996) 36:213-9
- [SSL94] Szeimies RM, Sassy T, Landthaler M. *Penetration potency of topical applied δ -aminolevulinic acid for photodynamic therapy of basal cell carcinoma*. J Photchem Photobiol [B] (1994) 59:73-6
- [THW91] Thody AJ, Higgins EM, Wakamatsu K, Ito S, Burchill SA, Marks JM. *Pheomelanin as well as eumelanin is present in human epidermis*. J Invest Dermatol (1991) 97:340-4
- [TRE83] Thiessen JJ, Rappaport PL, Eppel JG. *Indocyanine green pharmacokinetics in the rabbit*. Can J Physiol Pharmacol (1983) 62:1078-85
- [TPS93] Timberlake G, Patmore A, Shallal A, McHugh D, Marshall J. *Thermal and infrared-diode laser effects on indocyanine-green-treated corneal collagen*. SPIE (1993) 1882:244-53
- [TB96] Treweek SP, Barbenel JC. *Direct measurement of the optical properties of human breast skin*. Med & Biol Eng & Comput (1996) 34:285-9
- [TCG73] Tripp MR, Cohen GM, Gerasch DA, Fox IJ. *Effect of protein and electrolyte on the spectral stabilization of concentrated solutions of indocyanine green*. Proc Soc Exp Biol Med (1973) 143:879-83

- [TPS96] Troy TL, Page DL, Sevick-Muraca EM. *Optical properties of normal and diseased breast tissues*. J Biomed Opt (1996) 1:342-55
- [Val87] Valenzo DP. *Photomodification of biological membranes with emphasis on singlet oxygen mechanisms*. J Photochem Photobiol [B] (1987) 46:147-60
- [VWW94] Vitkin IA, Woolsey J, Wilson BC, Anderson RR. *Optical and thermal characterisation of natural (Sepia officinalis) melanin*. Photochem Photobiol (1994) 59:455-62
- [WAP81] Wan S, Anderson RR, Parrish JA. *Analytical modeling for the optical properties of the skin with in vitro and in vivo applications*. Photochem Photobiol (1981) 34:493-9
- [WPH92] Wang XF, Periasamy A, Herman B, Coleman DM. *Fluorescence lifetime imaging microscopy (FLIM): instrumentation and applications*. Crit Rev Anal Chem (1992) 23:369-95
- [WFM88] Watanabe S, Flotte TJ, McAuliffe DJ, Jacques SL. *Putative photoacoustic damage in skin induced by pulsed ArF excimer laser*. J Invest Dermatol (1988) 90:761-6
- [WKF97] Webber J, Kessel D, Fromm D. *Side effects and photosensitization of human tissue after aminolevulinic acid*. J Surg Res (1997) 68:31-7
- [WGD76] Weishaupt KR, Gomer CJ, Dougherty TJ. *Identification of singlet oxygen as the cytotoxic agent in photoinactivation of a murine tumor*. Cancer Res (1976) 36:2316-9
- [WGS99] Wennberg AM, Gudmundson F, Stenquist B, Ternesten A, Molne L, Rosen A, Larkö O. *In vivo detection of basal cell carcinoma using imaging spectroscopy*. Acta Derm Venereol (1999) 79:54-61
- [WLL00] Wennberg AM, Larkö O, Lönnroth P, Larson G, Krogstad AL. *Delta-aminolevulinic acid in superficial basal cell carcinomas and normal skin – a microdialysis and perfusion study*. Clin and Exp Dermatol (2000) 25:317-22
- [WSH93] Wessels JM, Sroka R, Heil P, Seidlitz HK. *Photodegradation of protoporphyrin-dimethylester in solution and in organized environment*. Int J Radiat Biol (1993) 64:475-84

- [WPF87] Wilson BC, Patterson MS, Flock ST. *Indirect versus direct techniques for the measurement of the optical properties of tissues*. Photochem Photobiol (1987) 46:601-8
- [WP93] Wittmann M, Penzkofer A. Chem Phys (1993) 172:339
- [WSA88] Wooten RS, Smith KC, Ahlquist DA, Muller SA, Balm RK, *Prospective study of cutaneous phototoxicity after systemic hematoporphyrin derivative*. Lasers Surg Med (1988) 8:294-300
- [YST99] Ya-Xian Z, Suetake T, Tagami H. *Number of cell layers of the stratum corneum in normal skin – relationship to the anatomical location on the body, age, sex and physical parameters*. Arch Dermatol Res (1999) 291:555-9
- [YVK93] Yang JZ, van Vugt DA, Kennedy JC, Reid RL. *Intrauterine 5-aminolevulinic acid induced selective fluorescence and photodynamic ablation of the rat endometrium*. J Photochem Photobiol [B] (1993) 57:803-7
- [You97] Young AR. *Chromophores in human skin*. Phys Med Biol (1997) 42:789-802
- [YYF97] Yuanlong Y, Yanming Y, Fuming L, Yufen L, Paozhong M. *Characteristic autofluorescence for cancer diagnosis and its origin*. Lasers Surg Med (1997) 7:528-32
- [ZK53] Zeniske A, Krahle JA. *The occurrence of urocanic acid in sweat*. Biochem Biophys Acta (1953) 12:479-84
- [ZPP83] Zimmerhackl B, Parekh M, Brinkhus H, Steinhausen M. *The use of fluorescent labelled erythrocytes for intravital investigation of flow and local hematocrit in glomerular capillaries in the rat*. Int J Microcirc Clin Exp (1983) 2:119-30
- [ZK96] Zinth W, Körner HJ. *Physik III – Optik, Quantenphänomene und Aufbau der Atome*. Oldenbourg-Verlag, München (1996)
- [ZCA96] Zonios GI, Cothren RM, Arendt JT, Wu J, Van-Dam J, Crawford JM, Manoharan R, Feld MS. *Morphological model of human colon tissue fluorescence*. IEEE Trans Biomed Eng (1996) 43:113-21
- [Zra86] Zrakit D. Master thesis report, Massachusetts Institute of Technology (1986)

Danksagung

Mein herzlicher Dank gilt Herrn Prof. Dr. E. Lang, der mir immer mit Rat und Tat zur Seite stand und bei seinen Besuchen im Klinikum auch nicht vor dem weiten und steilen Weg zurückschreckte. Seine Ratschläge und Diskussionsbereitschaft waren mir eine große Hilfe bei der Bewältigung großer und kleiner Hindernisse.

Ebenso bedanke ich mich bei Herrn Prof. Dr. M. Landthaler für seine freundliche Aufnahme in der Klinik und Poliklinik für Dermatologie.

Weiterer großer Dank gilt PD Dr. R.-M. Szeimies und allen übrigen Mitgliedern der Arbeitsgruppe PDT, die mich an den zahlreichen Diskussionsforen der Arbeitsgruppe teilhaben ließen. Hierin konnte ich Einblick in unterschiedlichste Themenbereiche erhalten und die Erkenntnis gewinnen, dass eine interdisziplinäre Arbeitsweise meist am effektivsten ist.

Besonders herausheben möchte ich dabei Herrn Dr. W. Bäumler und Herrn Dr. C. Abels, die mir in vielen wissenschaftlichen Diskussionen neue Erkenntnisse vermitteln konnten und so den Fortgang der Arbeit sicherten.

Bei Frau P. Weiderer (geb. Unger) bedanke ich mich für ihre vorausschauende Arbeitsweise, ihre Unterstützung bei den Experimenten und den hervorragenden Kaffee. Herrn Dipl-Phys (in spe) S. Habeker danke ich für seine Hilfsbereitschaft und seine Nachhilfestunden in Sachen Computer.

Größter Dank gilt auch meinen Eltern, die durch ihre finanzielle und moralische Unterstützung meines Studiums diese Arbeit erst ermöglicht haben.

Und ganz besonders bedanke ich mich bei meiner Frau Kerstin, die meinen Blick in vielen (nicht-wissenschaftlichen) Diskussionen auf die wesentlichen Dinge im Leben gerichtet hat. Um Verständnis bitte ich an dieser Stelle auch meine Tochter Antonia, die oft auf mich verzichten musste und von Fluoreszenzquantenausbeute rein gar nix hält.